

# Der strukturelle und funktionelle Einfluss des Cytokins IFN $\gamma$ auf die Modulation proteasomaler Komplexsubtypen

## DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

*Doctor rerum naturalium* (Dr.rer.nat)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Diplom Biologin Carolin Schächterle

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Jan-Hendrik Olbertz

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Stefan Hecht, PhD

### Gutachter:

- 1) Prof. Dr. Peter-Michael Kloetzel
- 2) Prof. Dr. Wolfgang Dubiel
- 3) Prof. Dr. Harald Saumweber

Tag der mündlichen Prüfung: 08.11.2013

# Gliederung

<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>5</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>6</b>
1.1. Proteasomale Substrate.....	7
1.2. Markierung der proteasomalen Substrate.....	10
1.3. Intrazellulärer Pool an proteasomalen Komplexen.....	11
1.4. Aufbau und Funktion des 20S Proteasoms.....	13
1.5. Proteasomale Regulatoren und Aktivatoren.....	17
1.5.1. Der proteasomale Aktivator PA28 $\alpha/\beta$ .....	17
1.5.2. Der proteasomale Aktivator PA200.....	20
1.5.3. Der 19S regulatorische Komplex.....	22
1.6. Zielsetzung der Arbeit.....	29
<b>2 Material und Methoden.....</b>	<b>30</b>
2.1. Geräte und Chemikalien.....	30
2.2. Zellbiologische Methoden.....	32
2.2.1. Zellkultur.....	32
2.3. Mausmodell.....	34
2.4. Molekularbiologische Methoden.....	34
2.4.1. Plasmid <i>Maxi Prep</i> .....	34
2.5. Biochemische Methoden.....	35
2.5.1. Herstellung von Zell- und Gewebelysaten.....	35
2.5.2. Gelelektrophorese.....	35
2.5.3. Horizontale und vertikale native 2D PAGE.....	37
2.5.4. Immundetektion.....	39
2.5.5. Separation der Proteasompopulation.....	40
2.5.6. Immunpräzipitation.....	41
2.5.7. Massenspektrometrische Analyse von Proteinbanden.....	41
2.5.8. Elektronenmikroskopische Aufnahmen.....	42
2.5.9. Messung der proteasomalen Degradation.....	43

<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>46</b>
3.1.	Charakterisierung der proteasomalen Komplexe.....	46
3.2.	Das Aktivator assoziierte 20S Proteasom.....	48
3.3.	Das 26S/Hybridproteasom und 30S Proteasom.....	53
3.4.	Der proteasomale Aktivator PA200.....	57
3.5.	Vergleich der Degradationseffizienz von verschiedenen proteasomalen Komplexsubtypen.....	62
3.6.	Analyse der Expression und Inkorporation von proteasomalen Untereinheiten aus Herz- und Milzgewebelysat von C57Bl/6 (WT), LMP2 <sup>-/-</sup> und LMP7 <sup>-/-</sup> Mäusen.....	73
3.6.1.	Analyse der Expression von proteasomalen Untereinheiten in murinen Gewebelysaten.....	73
3.6.2.	Inkorporation der Immununtereinheiten in proteasomale Komplexe.....	76
3.7.	Heterogenität der 19S Regulator assoziierten proteasomalen Komplexe in Herz- und Milzgewebelysat von C57BL/6 Mäusen (WT), LMP2 <sup>-/-</sup> Mäusen und LMP7 <sup>-/-</sup> Mäusen.....	78
3.7.1.	Proteasomale Komplexformierung in Herz- und Milzgewebe aus C57Bl/6 Mäusen.....	78
3.7.2.	Identifikation des 26S/Hybridproteasoms aus dem Gewebelysat von C57Bl/6, LMP2 <sup>-/-</sup> und LMP7 <sup>-/-</sup> Mäusen.....	80
3.8.	Identifizierung weiterer proteasomaler Assoziationspartner.....	84
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>92</b>
4.1.	Der 20S core Komplex – eine hochvariable Protease.....	92
4.2.	Die Assoziation zwischen dem 20S <i>core</i> Komplex und den proteasomalen Regulatoren und Aktivatoren.....	94
4.2.1.	Die proteasomalen Komplexpartner PA28 $\alpha/\beta$ und PA200 – eine antagonistische Assoziation.....	95
4.2.2.	Das Monomer PA200 - eine aktivierende Funktion?.....	97
4.2.3.	Die Assemblierung des PA28 $\alpha/\beta$ -Hybridproteasoms – Induktion durch das Cytokin IFN $\gamma$ und durch die Defizienz der Immununtereinheit LMP7.....	98
4.3.	Die 19S Regulator assoziierten Proteasomsubtypen zeigen funktionelle Unterschiede in der Degradation eines ubiquitinierten Fusionsproteins.....	101

4.4.	Eine mögliche Assoziation zwischen dem Chaperonin TriC und dem Proteasom in lymphoiden Zellen.....	105
4.5.	Die hochvariable Proteasompopulation – eine Notwendigkeit für die proteolytische Plastizität.....	109
	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>111</b>
	<b>Anhang.....</b>	<b>119</b>
	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>132</b>



## Zusammenfassung

Das Ubiquitin-Proteasom-System stellt ein Prinzip des Proteinabbaus dar, dessen Kernelement eine multikatalytische Threoninprotease, das 20S Proteasom, ist. Dieser Komplex assembliert mit ein oder zwei 19S Regulatorkomplexen zu dem hochmolekularen 26S bzw. 30S Proteasom sowie mit dem PA28 $\alpha/\beta$  bzw. PA200 Aktivator zu niedermolekularen Komplexsubtypen. Eine parallele Assoziation von Aktivator und 19S Regulator wird Hybridproteasom genannt. Eine Infektion führt im Organismus zu der Ausschüttung von proinflammatorischen Cytokinen, z. B. Interferon  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ), die mit der Expression und Inkorporation von katalytisch aktiven Immununtereinheiten eine weitere Modulation des 20S Proteasoms induziert. Zu den proteasomalen Funktionen zählen die ubiquitinvermittelte Proteindegradation regulatorischer sowie oxidierter Proteine und eine Epitopgenerierung für die MHC-I vermittelte Antigenpräsentation. 19S assoziierte Komplexe bauen ubiquitinierte Substrate ab und regulieren dadurch die Proteinhomöostase, wobei den einzelnen Komplexsubtypen bislang keine spezifische Funktion zugeordnet wurde.

In dieser Studie konnte mit der Messung der proteasomalen Degradationseffizienz eines ubiquitinierten Fusionsproteins gezeigt werden, dass das 30S Proteasom (19S-20S-19S), eine bessere Degradations- und Deubiquitinierungseffizienz als das 26S Proteasom (20S-19S) aufweist. Das impliziert die Möglichkeit einer bidirektionalen Degradation, da der 19S Regulator für die ubiquitinabhängige Degradation essentiell ist. Die Inkorporation der Immununtereinheiten  $\beta$ 1/LMP2,  $\beta$ 2/MECL-1 und  $\beta$ 5/LMP7 verändert die Kombination an Schnittpräferenzen im katalytischen Zentrum und erhöht damit auch die Degradationseffizienz des Hybridproteasoms im Vergleich zum 26S Proteasom.

Der zeitliche Verlauf einer IFN $\gamma$  Stimulation zeigte, dass die Aktivatoren PA28 $\alpha/\beta$  und PA200 antagonistisch an das 20S Proteasom assoziieren und niedermolekulare Komplexsubtypen bilden, sodass in dieser Studie auch zum ersten Mal eine IFN $\gamma$  abhängige Assoziation des PA200 Monomers an das 20S Proteasom detektiert wurde. Die allgemeine Bezeichnung von PA200 als proteasomaler Aktivator ist allerdings fraglich, da gerade bei einer PA28 $\alpha/\beta$  Defizienz keine proteasomale Aktivität gemessen wurde.

In *ex vivo* Versuchen konnte gezeigt werden, dass die Defizienz von LMP7 mit der Assemblierung des Hybridproteasoms 19S-20S-PA28 $\alpha/\beta$  strukturell kompensiert wird, wobei die funktionelle Wirksamkeit aber offen bleibt.

In monozytären Zellen wurden in einem sehr hochmolekularen Komplex mit proteasomaler Aktivität mittels Massenspektrometrie proteasomale Untereinheiten und viele Komponenten der Proteinbiosynthese detektiert, was für eine Assoziation zwischen Proteasom und Polysomenkomplexen spricht. Eine kotranslationale Degradation kann auch die Assoziation des detektierten Chaperonins TriC erklären, wobei dieser Komplex, der ATP abhängig Proteine faltet, möglicherweise auch direkt mit dem Proteasom interagieren könnte, wie elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen.

# 1 Einleitung

Der kontrollierte Abbau von Proteinen spielt eine wichtige Rolle im reibungslosen Ablauf zellulärer Prozesse. Die dabei freigesetzten Peptidfragmente werden für eine metabolische Verwertung oder eine erneute Proteinbiosynthese zu Aminosäuren abgebaut. Alternativ kann das Peptidfragment auch für die Immunabwehr verwendet werden. In der Zelle haben sich so zwei verschiedene Strategien entwickelt, um Proteine abzubauen (Rock & Goldberg, 1999):

- Das endosomal-lysosomale System beinhaltet diverse Hydrolasen, die im sauren Milieu aktiv sind. Neben intra- und extrazellulären Proteinen werden via Hetero- bzw. Autophagozytose auch extrazelluläre Partikel und intrazelluläre Organelle für den Abbau aufgenommen und anschließend zersetzt (Ciechanover, 2005a).
- Das Proteasom ist eine multikatalytische Protease und kann sowohl im Cytoplasma als auch im Nukleus wirken. Es ist Hauptbestandteil des Ubiquitin-Proteasom-Systems (UPS) und bildet durch Interaktion mit verschiedenen Subkomplexen eine umfangreiche Proteasompopulation aus. Das 26S/30S Proteasom degradiert ubiquitinierte Proteine. Ein kleiner Teil der dabei generierten Peptidfragmente kann letztendlich als Epitop auf MHC-I Rezeptoren präsentiert werden. Dies dient der Kommunikation zwischen der Zelle und dem Immunsystem und ermöglicht einerseits die Toleranz der Zelle im Zellverbund, und andererseits kann die Zelle im Falle einer Infektion, eines Tumors oder bei der Transplantation von fremdem Gewebe gezielt beseitigt werden (Rock & Goldberg, 1999; Yewdell, Reits & Neefjes, 2003; Yewdell & Princiotta, 2012).

Die Autophagozytose wird ebenfalls über das Ubiquitin-System reguliert, wodurch beide Abbauewege näher verknüpft sind, als ursprünglich angenommen wurde (Kriegenburg, Poulsen, Koch, Krüger & Hartmann-Petersen, 2011).

## 1.1. Proteasomale Substrate

Cytoplasmatische, nukleäre sowie membranständige und ER (endoplasmatisches Retikulum) residente Proteine werden ihrer spezifischen Halbwertszeit entsprechend proteasomal degradiert. Weitere Substrate der proteasomalen Degradation sind inkorrekt synthetisierte Produkte (DRiPs = *defective ribosomal products*), die eine funktionslose Form des Genproduktes darstellen (Dolan, Bennink & Yewdell, 2011).

Die Ausschüttung von Interferonen sowie eine virale Infektion bewirken in der Zielzelle oxidativen Stress und eine erhöhte Translationsrate, die bei jedem dritten neusynthetisierten Protein fehlerhaft verläuft. Die Fehler können in der Transkription, Translation, Splicing, Assemblierung oder Faltung auftreten (Yewdell, Reits & Neefjes, 2003).

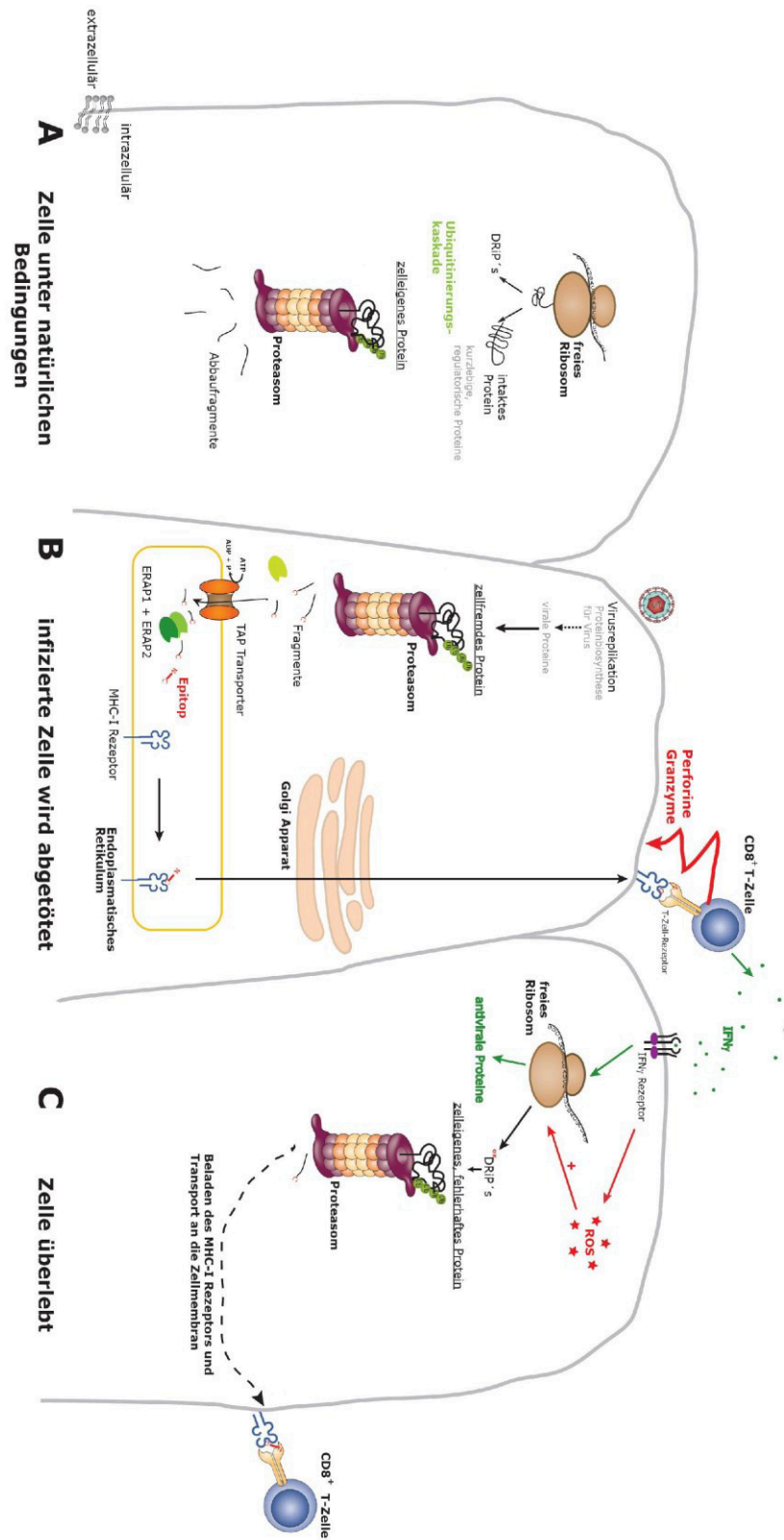
Neben zelleigenen Proteinen können auch zellfremde Proteine proteasomal abgebaut werden. Im Fall einer viralen Infektion können beispielsweise auch virale Hüllproteine, oder neusynthetisierte virale Proteine, als Substrat des Proteasoms dienen (Warnatsch, Bergann & Krüger, 2012). Die dabei fragmentierten Virusproteine können letztendlich zu Epitopen prozessiert werden, wobei das Proteasom den korrekten, MHC-I kompatiblen C-Terminus generiert (Strehl et al., 2008).

Nach der proteasomalen Degradation durchläuft das Peptidfragment eine Prozessierungskaskade, die zunächst Aminopeptidasen aus dem Cytoplasma umfasst. Diese trimmen das Fragment mit MHC-I kompatibelem C-Terminus nun auch N-terminal. Das Fragment gelangt dann mittels TAP-Transporter (*transporter associated with antigen processing*) ATP abhängig in das Lumen des endoplasmatischen Retikulums, wo ER residente Aminopeptidasen das Epitop ebenfalls N-terminal trimmen können. Das mehrfach getrimmte Epitop, letztlich acht bis elf Aminosäuren lang, wird mittels dem *peptide loading complex* auf einen MHC-I Rezeptor geladen und nach intrazellulärem Transport auf der Zelloberfläche präsentiert. Ist das antigene Peptid ein Fragment eines viralen Proteins können entsprechende cytotoxische CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten das Epitop über ihren spezifischen T-Zell-Rezeptor erkennen. Die T-Zelle initiiert anschließend die Apoptose der Antigen-präsentierenden Zelle. Die parallele Sekretion des antiviralen

Cytokins IFN $\gamma$  stimuliert benachbarte Zellen, die nun antivirale Proteine exprimieren um einer möglichen Virusinfektion entgegenzuwirken (vgl. Abb. 1-1) (vgl. Abb. 1-1 **B** und **C**). Die IFN $\gamma$  Stimulation führt außerdem zu oxidativem Stress. Dabei werden reaktive oxidierende Spezies (ROS) freigesetzt, welche das Peptidgrundgerüst von Proteinen zerschneiden oder Disulfidbrücken vernetzen können. Es entstehen oxidierte Proteine, die leicht zu ALIS (*aggresome-like induced structures*) aggregieren können. Weitere Oxidationsreaktionen erhöhen die Exposition von hydrophoben Seitenketten und führen letztendlich zu einer Proteinaggregation. Diese sogenannten Aggresomen assoziieren mit Mikrotubulifilamenten und lokalisieren, von einer Hülle aus Vimentin umgeben, am Centrosom. Diese Aggregate werden per Autophagozytose abgebaut, wohingegen ALIS, die oxidiert und ubiquitiniert vorliegen, proteasomal abgebaut werden. Die proteasomale Degradation kann die Zelle somit gezielt von nicht mehr benötigten oder schädlichen Proteinen befreien (Kriegenburg, Poulsen, Koch, Krüger & Hartman-Petersen, 2011; Warnatsch, Bergann & Krüger, 2012).

Zelleigene Proteine werden über den gleichen Weg prozessiert und als Epitop auf der Zelloberfläche präsentiert. Dabei stellen degradierte DRiPs das natürliche Reservoir für CD8<sup>+</sup> T-Zell-Epitope dar (Schubert et al., 2000). Sie lösen allerdings keine Immunantwort aus (vgl. Abb. 1-1 **A** und **C**).

Da nur etwa 0,1% aller ursprünglich degradierten Fragmente letztendlich als Epitop fungieren, werden die restlichen Peptide weiter abgebaut. Dabei freigesetzte Aminosäuren werden für die erneute Proteinbiosynthese verwendet. Damit stellen Proteinabbau und –aufbau eng verwobene Prozesse dar und das Proteasom besitzt im Ablauf der erlernten Immunantwort eine essentielle Funktion (Yewdell, Reits & Neefjes, 2003).



**Abb. 1-1 Die Rolle des Proteasoms.** **A** Das Proteasom ist als zentrales Element dargestellt. Es degradiert ubiquitinierte Proteine deren Abbaufragmente weiter verwendet werden. **B** Bei einer Virusinfektion können auch zellfremde Proteine proteasomal degradiert werden. Das Proteasom entlässt längere Fragmente mit MHC-I kompatiblen C-Termini. Cytosolische Aminopeptidasen können des entlassene Fragment N-terminal trimmen. Die Fragmente werden über den TAP Transporter in das ER transportiert und durch ER ständige Aminopeptidasen zum finalen Epitop getrimmt. Nach der Beladung auf den MHC-I Rezeptor erfolgt der Transport des Epitop/MHC-I Rezeptor-Komplexes über den Golgi-Apparat an die Zellmembran. An der Außenseite der Zellmembran findet dieser seine endgültige Position. Eine

passende CD8<sup>+</sup> T-Zelle erkennt über ihren T-Zell-Rezeptor das geladene Epitop und kann die Immunantwort einläuten. C Gleichzeitig wird das Cytokin IFN $\gamma$  sezerniert, welches die Expression von antiviralen Genen induziert und die Nachbarzelle somit zur Pathogenabwehr rüstet. Des Weiteren bewirkt die IFN $\gamma$  Stimulation oxidativen Stress, was auch die Translationsrate erhöht. Es entstehen DRiPs (*defective ribosomal particle*). DRiPs werden oxidiert, ubiquitiniert und anschließend degradiert. Sie dienen als natürliches Reservoir der MHC-I Präsentation bei einer nichtinfizierten Zelle (erstellt nach Yewdell, Reits & Neefjes, 2003).

## 1.2. Markierung der proteasomalen Substrate

Der proteasomalen Degradation von Proteinen geht der ATP abhängige Prozess der Ubiquitinierung voraus. Diese reversible, enzymatische Reaktionskaskade stellt eine Art der posttranslationalen Modifikation dar (Komander 2009). Dabei ermöglichen drei einzelne Schritte die Anlagerung von Ubiquitinketten und alle beteiligten Komponenten werden unter dem Begriff Ubiquitin-Proteasom-System zusammengefasst. Ubiquitin ist etwa 8 kDa groß und wird ubiquitär exprimiert. Es markiert Proteine für den proteasomalen Abbau, erleichtert ihren Transport an das Proteasom und stärkt die Interaktion zwischen Proteasom und Substrat (Weissman, Shabek & Ciechanover, 2011). Im ersten Schritt der Ubiquitinierung erfolgt die Aktivierung des globulären Ubiquitins. Das Ubiquitin aktivierende Enzym (E1) bindet Ubiquitin über eine hochenergetische, labile Thiolesterverbindung. Im zweiten Schritt wird Ubiquitin auf das Ubiquitin konjugierende Enzym (E2) übertragen, wobei es ebenfalls eine Thiolesterverbindung eingeht. Die zuletzt beteiligte Ubiquitinligase (E3) ist substratspezifisch und kann das Ubiquitin im Falle einer HECT-Domäne (*homologous to E6AP carboxyl terminus*) E3-Ligase zunächst selbst binden und an das Substrat übertragen. Bindet das E2 allerdings an eine RING finger-Domäne (*really interesting new gene*) E3-Ligase, erfolgt der direkte Transfer seines Ubiquitins an die  $\epsilon$ NH<sub>2</sub>-Gruppe eines Lysinrestes am Substrat. Die Verknüpfung erfolgt über den C-Terminus, das Glycin<sup>77</sup> des Ubiquitins, wobei eine stabile Isopeptidbindung entsteht. Eine Wiederholung dieses Prozesses bewirkt eine Elongation der Ubiquitinkette. Die spezifische Auswahl der Substrate erfolgt über die Substratbindedomänen der E3-Enzyme, da sich im humanen Genom mehr als 600 E3-Enzyme finden lassen. Daneben gibt es nur wenige E1-Enzyme und 30 bis 40 E2-Enzyme (Weissman, Shabek & Ciechanover, 2011).

Die Verknüpfung zwischen einzelnen Ubiquitinmolekülen erfolgt über die  $\epsilon\text{NH}_2$ -Gruppe des Lysins, wobei Ubiquitin in seiner Aminosäuresequenz sieben mögliche Verknüpfungsstellen aufweist. Die  $\text{K}^{48}$  verknüpfte Kette ist bei einer Mindestlänge von vier Ubiquitinmolekülen das häufigste Degradationssignal (Komander, 2009; Kravtsova-Ivantsiv, Sommer & Ciechanover, 2012). Als Signal der proteasomalen Degradation dient neben der Ubiquitinkette auch eine entfaltete, intrinsische Domäne des abzubauenden Substrates (Zhao et al., 2009; Liu & Jacobsen, 2012).

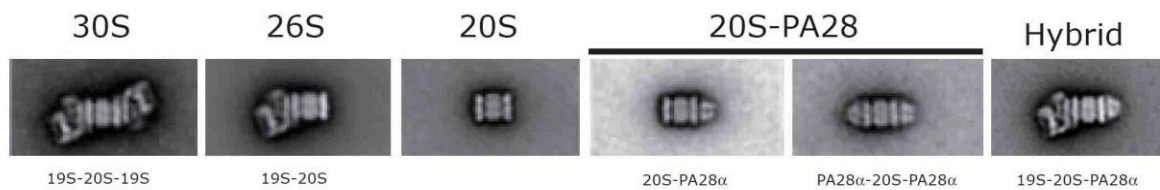
Erst kürzlich wurde gezeigt, dass auch eine Monoubiquitinierung als Degradationssignal ausreicht, sofern es sich um ein kleines Protein mit bis zu 150 Aminosäuren handelt. Größere Proteine sind in monoubiquitinierten Form stabil und können erst nach einer Polyubiquitinierung proteasomal degradiert werden (Shabek et al., 2012). Daneben zählen u.a. auch die Multimonoubiquitinierung sowie verzweigte Ubiquitinketten und  $\text{K}^{29}$ ,  $\text{K}^{11}$ ,  $\text{K}^{27}$  und  $\text{K}^6$  verknüpfte Ketten (in absteigender Häufigkeit) und  $\text{K}^{33}$  und  $\text{K}^{63}$  als Degradationssignal. Diese Varianz an Degradationssignalen kann mit der unzähligen Menge an proteasomalen Substraten begründet sein und eine Hierarchie im Proteinabbau ermöglichen, die den Transport an das Proteasom, die Deubiquitinierung und die Degradation umfassen kann (Kravtsova-Ivantsiv, Sommer & Ciechanover, 2012).

### **1.3. Intrazellulärer Pool an proteasomalen Komplexen**

Das zentrale Element des Proteasoms wird 20S *core* Komplex genannt. Um seine Funktion zu erhalten, muss es mit dem 19S regulatorischen Komplex, oder den Aktivorkomplexen, PA28 oder PA200, assoziieren. Diese öffnen einerseits den Zugang und selektieren andererseits Substrate.

Cascio et al. konnten 2002 mittels Elektronenmikroskopie diverse proteasomale Komplexe, teilweise artifiziell assembliert, darstellen (vgl. Abb. 1-2).





**Abb. 1-2 Proteasomentypen.** Cryo-Elektronenmikroskop-Aufnahmen von proteasomalen Komplexen, welche mit dem 19S Regulator und dem homoheptameren PA28 $\alpha$ -Aktivator assoziiert sind. 20S und 26S Komplexe wurden aus Kaninchenmilz isoliert; murine PA28 $\alpha$ -Homoheptamere wurden in *E.coli* rekombinant exprimiert und mit isoliertem 26S zu Hybridproteasomen rekonstituiert. Ob endogene 20S-PA28 Komplexe einfach oder zweifach assoziiert sind, konnte so nicht geklärt werden (modifiziert nach Cascio et al., 2002).

Am 20S *core* Komplexes weisen zwei  $\alpha$ -Ringe nach außen, was den Regulatoren und Aktivatoren die ein- oder beidseitige Assoziation mit dem 20S Proteasom ermöglicht. In Bezug auf den 19S regulatorischen Komplex entstehen damit **19S-20S** bzw. **19S-20S-19S**, die auch als **26S** bzw. **30S Komplex** bezeichnet werden und ubiquitinierte Proteine abbauen (Peters et al., 1995).

Analog dazu vermag auch der PA28 Aktivator an einen oder beide  $\alpha$ -Ringe zu binden um **20S-PA28** bzw. **PA28-20S-PA28** Komplexe zu bilden (Dubiel et al., 1992). Die Aktivität ist bei *in vitro*-Analysen auf den Verdau kurzer, ungefalteter Peptide limitiert, wobei die physiologische Funktion bislang nicht geklärt werden konnte. Eine Interaktion zwischen PA28 mit dem 26S Proteasom wird als sogenanntes **Hybridproteasom (PA28-20S-19S)** bezeichnet (Hendil et al., 1998). Es handelt sich dabei um Komplexe mit PA28 $\alpha/\beta$  Heteroheptameren oder homoheptamerem PA28 $\gamma$ . Das Hybridproteasom **PA28 $\alpha/\beta$ -20S-19S** zeigt den gleichen fluorogenen Substratumsatz wie das 26S Proteasom, sowie eine ähnliche Degradation des Ubiquitin-unabhängigen Substrates ODC (*ornithin decarboxylase*), sodass diesem proteasomalen Subtyp bislang keine spezifische physiologische Rolle zugeschrieben werden konnte. Ein Einfluss auf die Schnittpräferenz oder die verbesserte Austrittsmöglichkeit von restringierten Fragmenten wird diskutiert (Hendil et al., 1998; Tanahashi et al., 2000; Kopp, Dahlmann und Kühn, 2001). **PA200** kann ebenfalls ein- oder beidseitig an den 20S *core* Komplex binden (Hoffman et al., 1992). Eine Interaktion zwischen PA200 und 26S Proteasom bildet eine weitere Form des Hybridproteasoms, die an DNA-Doppelstrangbrüche rekrutiert werden kann, wenn diese durch ionisierende Strahlung künstlich induziert wurden (Blickwedehl et al., 2008).



Generell gibt es Hinweise auf einen Einfluss von PA200 bei der 20S-Assemblierung, der Regulation der genomischen Stabilität oder der Spermatogenese, wobei seine Funktion auf Seiteneffekte limitiert sein kann (Stadtmueller & Hill, 2011).

Bislang werden in der Literatur die hochmolekularen proteasomalen Komplexe 26S, Hybrid und 30S unter dem Begriff „26S Proteasom“ zusammengefasst. Eine Differenzierung in einzelne Komplexsubtypen bleibt meistens aus. Da die vorliegende Arbeit strukturelle und funktionelle Unterschiede der einzelnen Komplexsubtypen charakterisieren sollte, erfolgt die Einführung einer Nomenklatur, die im Folgenden verwendet wird:

niedermolekulare proteasomale Komplexe	hochmolekulare proteasomale Komplexe	
<u>Aktivator assoziiertes 20S Proteasom</u>	<u>26S/Hybridproteasom</u>	<u>30S Proteasom</u>
PA28 $\alpha$ / $\beta$ -20S PA28 $\gamma$ -20S PA200-20S	19S-20S PA200-Hybrid PA28 $\alpha$ / $\beta$ -Hybrid	19S-20S-19S

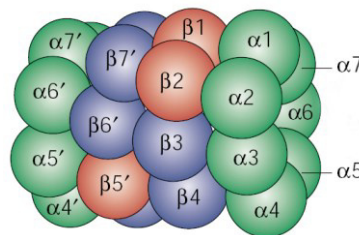
Tabelle 1-1 Einteilung und Nomenklatur der proteasomalen Komplexe.

#### 1.4. Aufbau und Funktion des 20S Proteasoms

Das 20S Proteasom ist das katalytische Element des Ubiquitin-Proteasom-Systems (UPS) und schneidet Polypeptidketten (Rock & Goldberg, 1999).

Diese Form des Abbaus ist in der Evolution fest verankert. Er lässt sich in Archäen, Eubakterien und Eukaryoten nachweisen. Allen gemein ist das 20S *core* Proteasom, welches das proteasomale Grundgerüst bildet: die zylindrische Struktur besteht aus vier heptameren Ringen, wobei die äußeren  $\alpha$ -Untereinheiten die inneren  $\beta$ -Untereinheiten flankieren.

Das Proteasom aus Archäen und Eubakterien weist eine siebenfache Symmetrie auf, da identische  $\alpha$ - bzw.  $\beta$ -Untereinheiten im heptameren Ring assemblieren, wobei die proteolytische Aktivität durch die Untereinheiten des  $\beta$ -Rings vermittelt wird. Eukaryonten exprimieren dagegen sieben homologe aber unterschiedliche Untereinheiten  $\alpha 1 - \alpha 7$  bzw.  $\beta 1 - \beta 7$ , die im heptameren Ring individuelle Positionen besetzen (vgl. Abb. 1-3) (Goldberg, 2007; Stadtmueller & Hill, 2011).



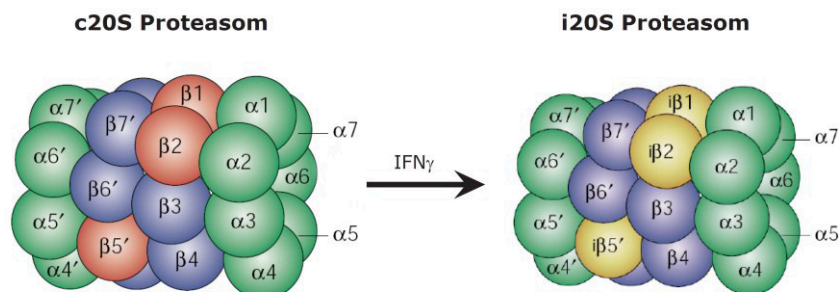
**Abb. 1-3 Das 20S Proteasom** vier heteroheptamere Ringe aus sieben verschiedenen  $\alpha$ -Untereinheiten (grün) bzw. sieben verschiedenen  $\beta$ -Untereinheiten (blau) assemblieren zu einem 20S *core* Komplex. Die proteolytisch aktiven Untereinheiten  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  und  $\beta 5$  sind rot markiert (modifiziert nach Kloetzel, 2001).

Die katalytische Aktivität ist bei Eukaryonten auf drei der sieben  $\beta$ -Untereinheiten limitiert.  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  und  $\beta 5$  zählen zu den N-terminalen Threonin-Hydrolasen. Dieser Proteasentyp wurde später als die Serin- oder Cysteinproteasen entdeckt und weist ein N-terminales Threonin (Thr1) auf. Die Hydroxygruppe der Threonin-Seitenkette attackiert ein freies N-terminales Amin ( $\text{NH}_2$ -) am Substrat und initiiert damit die hydrolytische Spaltung der Peptidbindung (Rock & Goldberg, 1999; Groll & Clausen, 2003; Ciechanover 2005b; Stadtmueller & Hill, 2011).

Jede Untereinheit besitzt dabei eine spezifische Schnittpräferenz wodurch das Substrat mittels drei verschiedener hydrolytischer Aktivitäten an diversen Positionen seiner Aminosäuresequenz geschnitten wird. So können  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  und  $\beta 5$  hinter sauren, basischen bzw. großen hydrophoben Aminosäuren schneiden und damit die sogenannte caspaseähnliche, die trypsinähnliche bzw. die chymotrypsinähnliche Aktivität vermitteln (Goldberg, 2007; Stadtmueller & Hill, 2011).

Eine evolutionäre Veränderung der höheren Eukaryoten stellt die Induktion von speziellen, hydrolytisch aktiven Immununtereinheiten dar, die die Ausbildung einer

proteasomalen Isoform, dem sogenannten Immunoproteasom (i20S), zur Folge hat. Die Assemblierung des Immunoproteasoms erfolgt u.a. nach einer  $\text{IFN}\gamma$  Stimulation und weist die alternativen Untereinheiten  $\text{i}\beta 1$  (LMP2),  $\text{i}\beta 2$  (MECL-1) und  $\text{i}\beta 5$  (LMP7) auf (vgl. Abb. 1-4) (Aki et al., 1994; Groettrup, 1996a).



**Abb. 1-4 Das i20S Proteasom** Durch  $\text{IFN}\gamma$ -Stimulation wird bei der Neuassemblierung des 20S *core* Komplex der Einbau der alternativen Untereinheiten  $\text{i}\beta 1$ ,  $\text{i}\beta 2$  und  $\text{i}\beta 5$  (gelb) initiiert (modifiziert nach Klotzel, 2001).

Unter Bedingungen wie Inflammation und Infektion wird das antivirale und proinflammatorische Cytokin  $\text{IFN}\gamma$  u.a. von  $\text{CD4}^+$  T-Helferzellen oder  $\text{CD8}^+$  cytotoxischen T-Lymphozyten ausgeschüttet und bindet auf der Zielzelle an heterodimere  $\text{IFN}\gamma$  Rezeptoren. Dieses Signal führt zu der intrazellulären Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT1, der die Transkription und Translation von diversen  $\text{IFN}\gamma$  sensiblen Genen induziert (Sadler & Williams, 2008). Während der Neuassemblierung orchestriert das Chaperon POMP (*proteasome maturing protein*) die Rekrutierung und Verknüpfung der konstitutiven sowie induzierbaren  $\beta$ -Untereinheiten. Die Immununtereinheit  $\text{i}\beta 5$  zeigt dabei eine höhere Affinität zu POMP als  $\beta 5$ , wodurch die Assemblierungskinetik des Immunoproteasoms der Kinetik der Assemblierung des 20S *core* Komplexes überlegen ist (Heink et al., 2005).

Das Immunoproteasom weist im Vergleich zum Standardproteasom Konformationsänderungen im Substrat-bindenden Bereich auf, wodurch sich beispielsweise die Spaltung nach hydrophoben Aminosäuren erhöht sowie die nach sauren Aminosäuren vermindert, da  $\text{i}\beta 1$  präferiert nach einer hydrophoben Aminosäure schneidet (Huber et al., 2012).

Werden nicht alle Immununtereinheiten in den 20S *core* Komplex eingebaut, spricht man von dem intermediären 20S *core* Komplex, bzw. *mixed type* 20S (m20S) (Dahlmann et al., 2000). Die Immununtereinheit  $\text{i}\beta 5$  kann beispielsweise auch in einen 20S *core*

Komplex inkoporiert werden, der die konstitutiven Untereinheiten  $\beta 1$  und  $\beta 2$  trägt (Kloetzel, 2004; Goldberg, 2007; Borissenko & Groll, 2007; Stadtmueller & Hill, 2011).

Neben dem Typ II Interferon  $\text{IFN}\gamma$  induzieren die Typ I Interferone  $\text{IFN}\alpha$  und  $\text{IFN}\beta$  oder auch  $\text{TNF}\alpha$  die Expression der alternativen Untereinheiten (Sadler & Williams, 2008).

Exklusiv für Thymusgewebe existiert eine weitere alternative Untereinheit zu  $\beta 5$ , das thymusspezifische  $\beta 5_T$  Protein. Es wird vermutet, dass der Einbau dieser Untereinheit das Schnittverhalten nach hydrophoben Aminosäuren minimiert und gleichzeitig Peptide generiert, die eine geringere Affinität zu MHC-Klasse I Molekülen aufweisen. Es wird mit den Immununtereinheiten  $i\beta 1$  und  $i\beta 2$  in den  $\beta$ -Ring eingebaut (Murata et al., 2007).

Die katalytisch aktiven Untereinheiten, sowie  $\beta 6$  und  $\beta 7$  werden als Propeptid translatiert; vor dem Einbau in den neuassemblierten 20S *core* Komplex wird der N-Terminus autokatalytisch abgespalten und exponiert das reaktive N-terminale Threonin (Rock & Goldberg, 1999; Bar-Nun & Glickman, 2011). Die katalytisch aktiven N-Termini lokalisieren im Zentrum des 20S *core* Komplexes und ragen in das Innere der fassähnlichen Struktur. Freies 20S ist selbstinhibiert, da der Zugang zu den hydrolysierenden Untereinheiten auf zweierlei Weisen unterbunden ist. Einerseits beschränkt die enge, ringförmige Assoziation der  $\alpha$ -Untereinheiten den Eintritt in das Innere des Proteasoms, da die gebildete Pore einen Durchmesser von lediglich 13 Å misst. Der Zugang von gefalteten Proteinen ist dadurch nicht möglich; es bedarf der vorherigen Entfaltung des abzubauenen Substrats. Des Weiteren wird der Zugang durch die N-Termini der  $\alpha$ -Untereinheiten verschlossen, was dem steten Eintritt von Polypeptiden entgegen wirkt. Die elongierten 35 Aminosäuren der N-Termini, die die Konformation einer  $\alpha$ -Helix einnehmen, ragen in die Pore und blockieren diese. Erst die Anlagerung proteasomaler Aktivatoren und deren Interaktion mit dem  $\alpha$ -Ring induziert eine Konformationsänderung der N-terminalen  $\alpha$ -Helices womit der Zugang ins katalytische Zentrum des 20S Proteasoms frei wird. Die Konformationsänderung betrifft vier  $\alpha$ -Untereinheiten ( $\alpha 2/\alpha 3/\alpha 4/\alpha 5$ ). Sie nehmen die kompaktere Konformation der drei, stets unveränderten  $\alpha$ -Untereinheiten ( $\alpha 1/\alpha 6/\alpha 7$ ) ein (Whitby et al., 2000; Stadtmueller & Hill, 2011; Saeki & Tanaka, 2007).

Da der Austausch der alternativen Immunountereinheiten zu keiner veränderten Positionierung der  $\alpha$ -Untereinheiten führt, kann die Rotation der  $\alpha$ -Untereinheiten das c20S und i20S Proteasom gleichermaßen öffnen (Huber et al., 2012).

## 1.5. Proteasomale Regulatoren und Aktivatoren

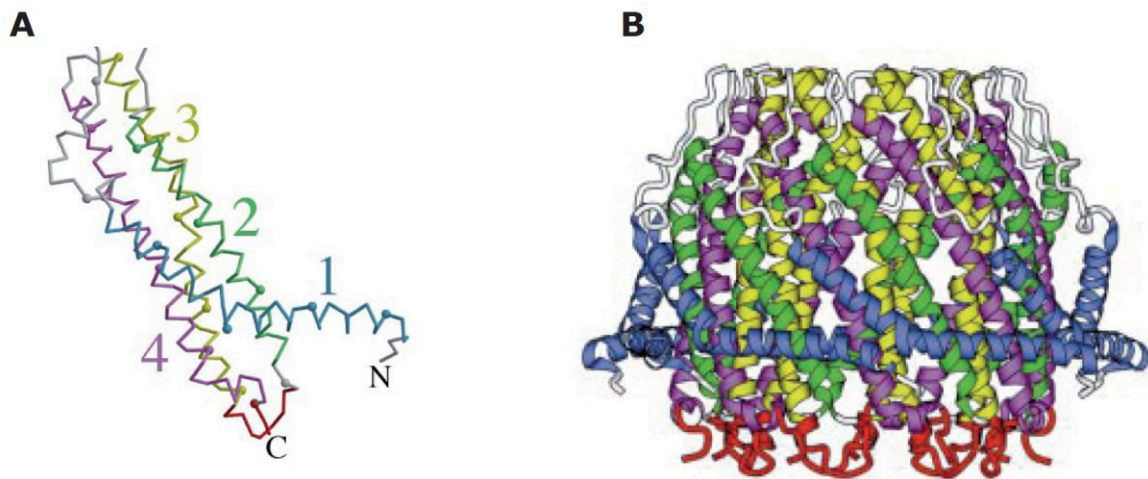
Als proteasomale Assoziationspartner sind bislang drei unterschiedliche regulatorische und aktivierende Komponenten bekannt. Sie sind jeweils eigenständige Komplexe, erreichen allerdings nur in Kombination mit dem 20S Proteasom ihre Funktion. Des Weiteren kommen sie für die Selektion von Substraten in Betracht.

### 1.5.1. Der proteasomale Aktivator PA28 $\alpha/\beta$

Das Cytokin IFN $\gamma$  bewirkt nicht nur die Expression der proteasomalen Immunountereinheiten i $\beta$ 1, i $\beta$ 2 und i $\beta$ 5, sondern auch die erhöhte Expression von PA28 $\alpha$ - und PA28 $\beta$ -Untereinheiten (Ahn et al., 1996). Beide dimerisieren und bilden einen heteroheptameren Ring, den PA28 $\alpha/\beta$ -Aktivator (Realini et al., 1994). Die Homologie der beiden Untereinheiten spiegelt sich auch in PA28 $\gamma$  wider. Diese dritte Isoform wird konstitutiv exprimiert, ist im Kern lokalisiert und assembliert zu homoheptameren Ringen (Rechsteiner & Hill, 2005).

Die Isoformen werden in fast allen Gewebetypen höherer Eukaryonten exprimiert. PA28 $\alpha$  und PA28 $\beta$  sind in Immunzellen hochabundant, in Gehirngewebe dahingegen kaum exprimiert. PA28 $\gamma$  wird im Gegensatz dazu in Gehirngewebe relativ stark exprimiert, zeigt aber keinen Bezug zu Infektion und Inflammation (Rechsteiner & Hill, 2005).

Der heteroheptamere PA28 $\alpha/\beta$  Komplex besteht aus drei PA28 $\alpha$ - und vier PA28 $\beta$ -Untereinheiten und bildet quartärstrukturell einen „hohlen Kegel“ (vgl. Abb. 1-5) (Knowlton et al., 1997).



**Abb. 1-5 Der PA28α Komplex.** **A** In der Tertiärstruktur von PA28α erkennt man vier  $\alpha$ -Helices (mit blau, grün, gelb und lila unterschiedlich koloriert). Die roten Segmente stellen Interaktionsdomänen zum proteasomalen  $\alpha$ -Ring dar und bestehen aus dem C-Terminus und dem Loop zwischen  $\alpha$ -Helix zwei und drei. Die vier  $\alpha$ -Helices des Monomers sind über hydrophobe Wechselwirkungen miteinander verbunden. **B** Sieben Untereinheiten assemblieren, über hydrophobe und polare Bindungen assoziiert, zu einem Homoheptamer. Ein heteroheptamerer Komplex aus PA28α- und PA28β-Untereinheiten ist in seiner Struktur und Funktion sehr ähnlich (modifiziert nach Knowlton et al., 1997).

Mit einer Porengröße von 20-30 Å im Durchmesser bildet der PA28α/β Komplex eine deutlich größere Pore als der proteasomale  $\alpha$ -Ring, der durch die Anlagerung des Aktivators ATP-unabhängig geöffnet wird (Kisselev et al., 2002; Stadtmueller & Hill, 2011). Studien an *Trypanosoma brucei* konnten zeigen, dass die C-Termini von PA26, einem Homolog zu PA28, ebenfalls in Bindetaschen zwischen den einzelnen proteasomalen  $\alpha$ -Untereinheiten binden und ihre beschriebene Konformationsänderung am  $\alpha$ -Ring bewirken. Da PA26- und PA28-Komplexe den 20S *core* Komplex auch speziesunabhängig aktivieren können, sind die Bindungen zwischen ihren C-Termini und den proteasomalen Taschen im  $\alpha$ -Ring eher schwach (Whitby et al., 2000).

Funktionell gesehen induziert der PA28α/β Komplex die Öffnung der proteasomalen Pore und kann so die Substratzugänglichkeit ins Innere des Proteasoms erhöhen. Da PA28α/β Komplexe auch beidseitig am 20S Proteasom binden können, wird neben dem Einlass der Substrate auch die Freisetzung der Fragmente erleichtert (Stohwasser et al., 2000). Des Weiteren kann die durch die Assoziation induzierte Konformationsänderung der proteasomalen  $\alpha$ -Untereinheiten auch auf die  $\beta$ -Untereinheiten übertragen werden. Das Polypeptid kann somit stärker an das aktive Zentrum einzelner  $\beta$ -Untereinheiten binden

und wird so auch parallel durch mehrere Untereinheiten geschnitten, was vor allem bei Peptiden mit einem N- und C-terminal flankiertem Epitop nötig ist (Dick et al., 1996; Stohwasser et al., 2000): ein Peptid wird im nichtassoziierten 20S Proteasom zunächst nur einmal geschnitten. Nach dem Schnitt diffundiert es von dem aktiven Zentrum einer  $\beta$ -Untereinheit zu einem weiteren aktiven Zentrum, um erneut geschnitten zu werden. Die Assoziation von PA28 $\alpha/\beta$  ermöglicht einen sofortigen koordinierten Doppelschnitt (*coordinated double cleavage mechanism*).

Viele Studien konnten zeigen, dass PA28 $\alpha/\beta$  einen positiven Einfluss auf die proteasomale Epitopgenerierung für MHC-I Rezeptoren haben kann (zusammengefasst in Sijts & Kloetzel, 2011). Beispielsweise wird in diversen Melanomzellen das Fragment TRP2<sub>360-368</sub>, ein Epitop von TRP2 (*tyrosinase related protein 2*), in Abhängigkeit von einer PA28 $\alpha/\beta$  Assoziation generiert (Sun et al., 2002). Textoris-Taube et al. stellten fest, dass dabei die N-terminal flankierende Sequenz dieses Epitops die essentielle Rolle von PA28 $\alpha/\beta$  bedingt (Textoris-Taube et al., 2007). Der positive Effekt von PA28 $\alpha/\beta$  lässt sich allerdings nicht auf alle Peptide übertragen, da die Generierung des Fragments TRP2<sub>288-296</sub> beispielsweise keine Korrelation zu einer PA28 $\alpha/\beta$  Assoziation aufweist (Sun et al., 2002).

Da eine Infektion oder eine IFN $\gamma$  Stimulation neben den Komponenten des PA28 $\alpha/\beta$  Aktivators auch die Immunountereinheiten induziert, untersuchten de Graaf et al. den Einfluss beider Faktoren auf die Antigenpräsentation. Sie zeigen, dass die Addition von PA28 $\alpha/\beta$  an das c20S oder i20S Proteasom *in vitro* keine neuen spezifischen Schnitte initiiert, sondern die Generierung von MHC-I Epitopen bei beiden Isoformen gleichermaßen verstärkt (de Graaf et al., 2011). Am Beispiel des Coxsackievirus B3 Proteins VP2 konnte die Assoziation von PA28 $\alpha/\beta$  ebenfalls bei beiden Proteasomisoformen eine Steigerung der Epitop- und Precursorgenerierung detektieren (Dissertation Sandra Jäkel, 2009). Oftmals zeigt das Immunoproteasom eine schnellere Generierung oder die Generierung größerer Mengen an potentiellen Epitopen als das konstitutive 20S Proteasom, welches aber grundsätzlich auch potentielle Epitope generieren kann (zusammengefasst in Sijts & Kloetzel, 2011).



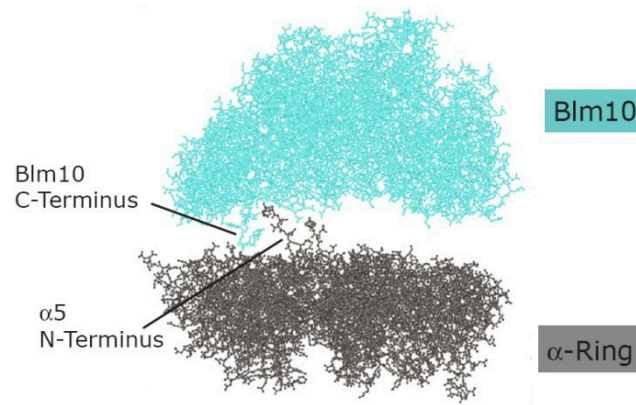
Jedes Proteinsubstrat scheint einen individuellen Ablauf der Epitopprozessierung zu benötigen, sodass nur die proteolytische Plasizität, durch die verschiedenen proteasomalen Isoformen und eine mögliche PA28 $\alpha/\beta$  Assoziation gewährleistet, eine erfolgreiche Immunantwort ermöglicht.

### 1.5.2. Der proteasomale Aktivator PA200

PA200 wird ebenfalls als Aktivator des 20S *core* Komplexes bezeichnet, auch wenn die aktivierende Funktion umstritten ist (Hoffman et al., 1992; Lehmann et al., 2008). Dieser proteasomale Komplexpartner ist ein Monomer, besitzt ein Molekulargewicht von 200 kDa und lokalisiert hauptsächlich im Nukleus. Die Tertiärstruktur wird aus 32 spulenähnlichen Superhelices aus jeweils ca. 50 Aminosäuren, den sogenannten HEAT-Domänen (*Huntingtin* - *elongation factor 3* - *PR65/A subunit of PP2A* - *lipid kinase TOR*), gebildet. Evolutionär gesehen ist PA200 zu 20% zwischen Hefe (Homolog: Blm10) und Säugetieren konserviert (Savulescu & Glickman, 2011). Da sowohl PA200 als auch Blm10 die HEAT-Domänen aufweisen und maturiertes 20S binden, vermutet man, dass beide eine ähnliche strukturelle und biochemische Funktion aufweisen (Iwanczyk et al., 2006). Die  $\alpha$ -Helices der HEAT-Domänen bilden eine flexible „Kuppel“, die trotz des großen Volumens eine vergleichbar kleine Pore bildet und lediglich den Zutritt von Peptiden erlaubt. Zur Öffnung des proteasomalen  $\alpha$ -Rings bindet das C-terminale YYX-Motiv von PA200 in die Tasche zwischen  $\alpha 5$  und  $\alpha 6$  und bewirkt demnach keine direkte Konformationsänderung der vier  $\alpha$ -Untereinheiten (vgl. Abb. 1-6) (Dange et al., 2011). Eine vollständige Öffnung der proteasomalen Pore, wie der PA28 $\alpha/\beta$  Komplex oder der 19S Regulator es vermögen, kann die Anlagerung von PA200 im Vergleich nicht bewirken. Diese interagieren aufgrund ihres polymeren Aufbaus über mehrere C-Termini mit den proteasomalen  $\alpha$ -Untereinheiten. Der umsatzsteigernde Effekt der Interaktion zwischen dem c20S Proteasom und PA200 ist deshalb auf die Erhöhung der  $\beta 1$ - und  $\beta 2$ -Schnittpräferenz und den Verdau von Peptiden limitiert (Blickwedehl et al., 2008; Stadtmueller & Hill, 2011; Dange et al., 2011). Hefestudien konnten aufzeigen, dass



Blm10-20S die Peptidhydrolyse im Vergleich zu freiem 20S Proteasom erhöht. Der Komplex Blm10-20S-Blm10 scheint die Hydrolyse allerdings zu unterdrücken (Lehmann et al., 2008).



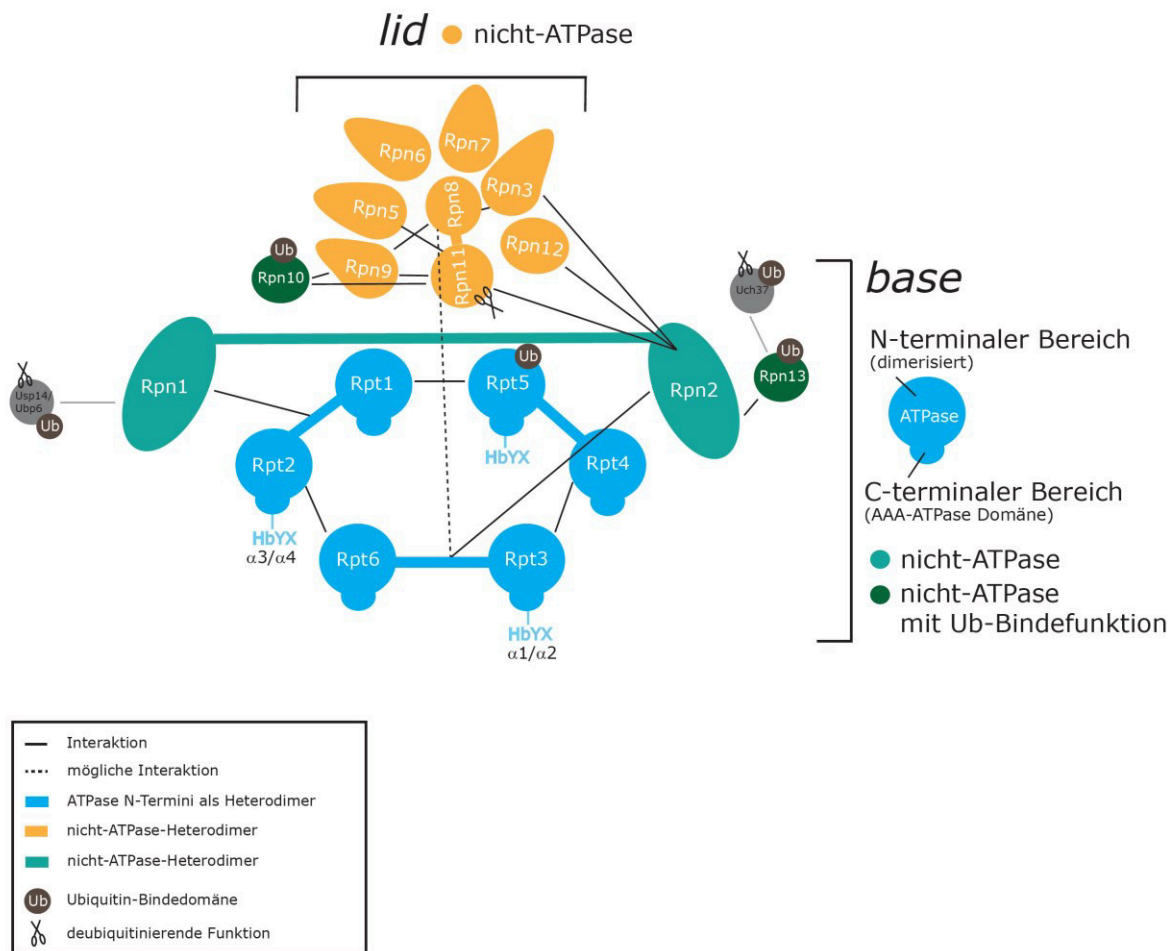
**Abb. 1-6 Die Interaktion zwischen dem proteasomalen α-Ring (grau) und dem Blm10 Aktivator (blau).** Die letzten drei Aminosäuren des Blm10-C-Terminus (exponierter Arm in blau) binden in die Tasche der proteasomalen Untereinheiten α5 und α6. Die dadurch ausgelöste Rotation des α5 N-Terminus in Richtung von Blm10 (exponierter Arm in grau) bewirkt eine partielle Öffnung der proteasomalen Pore und ermöglicht den Eintritt kleiner Substrate (modifiziert nach Savalescu & Glickman, 2011).

Ustrell et al. konnten in HeLa Zellen durch Immunfluoreszenz zeigen, dass PA200 zu großen Teilen im Kern lokalisiert, da PA200 im Cytoplasma nur minimal nachgewiesen wurde; eine Fraktionierung zeigte kein PA200 im Cytoplasma (Ustrell et al., 2002). In der humanen Monozyten-ähnlichen Zelllinie U937 Zellen konnte PA200 zu gleichen Teilen im Zellkern und im Nukleus detektiert werden (Fabre et al., 2013).

### 1.5.3. Der 19S regulatorische Komplex

Strukturelle Analysen konnten diesem ATP-abhängigen Aktivator bislang 18 verschiedene Untereinheiten zuordnen, die zu zwei Subkomplexen, *base* und *lid*, assemblieren. Sechs ATPasen (Rpt1-Rpt6 = *regulatory particle ATPases*) und 12 Untereinheiten ohne ATPase-Funktion (Rpn1-Rpn3; Rpn5-Rpn13 ; *regulatory particle non ATPases*) ergeben ein Molekulargewicht von 700 kDa und sind für den ubiquitin-vermittelten Substratabbau essentiell. Die wichtigsten Funktionen des regulatorischen Partikels sind das Öffnen der proteasomalen Pore sowie das Binden der Ubiquitinkette mit anschließendem Deubiquitinieren, Entfalten und Translozieren des Proteinsubstrates. Diese Schritte sind (mit Ausnahme des Bindens der polyUb-Ketten) ATP-abhängig, wodurch Öffnen, Entfalten und Translokation von den ATPasen bewerkstelligt wird (Bar-Nun & Glickman, 2011).

Die ATPasen werden aufgrund ihrer C-terminalen AAA-Domäne der AAA<sup>+</sup> Proteinfamilie (*ATPases associated to a variety of cellular activities*) zugeordnet. Wird ATP gebunden oder hydrolysiert, verändern sie ihre Konformation, wodurch mechanische Kraft entsteht, die wiederum für die Konformationsänderung anderer Proteine genutzt werden kann. Das ist mit der Funktion eines Chaperons vergleichbar (Bar-Nun & Glickman, 2011). Rpt1 – Rpt6, die ATPasen des regulatorischen Partikels, assoziieren zu einem Hexamer, in dem jede einzelne Untereinheit eine feste Position besetzt (vgl. Abb. 1-7) (Tomko & Hochstrasser, 2011). Strukturbiochemisch gesehen bilden die ATPasen, basierend auf AAA-Domänen und N-Termini, zwei Pseudoringe aus. Die AAA-Domänen verknüpfen sich zu einem hexameren Pseudoring, der dem 20S *core* Komplex zugewandt ist. Die N-Termini bilden einen weiteren Pseudo-Ring, allerdings mit dreifacher Symmetrie, da stets zwei N-terminale Abschnitte dimerisieren, wodurch ein Trimer resultiert (vgl. Abb. 1-7 und Abb. 1-8) (Lasker et al., 2012).



**Abb. 1-7 Interaktionen der 19S Untereinheiten.** Die beiden nicht-ATPasen Rpn1 und Rpn2 sind die größten Untereinheiten des 19S Regulators und verknüpfen *lid* mit *base*. Die ATPasen bilden die Grundstruktur der *base* und assemblieren zu einem hexameren Ring, wobei stets zwei ATPasen am N-Terminus dimerisieren (Rpt1/Rpt2, Rpt3/Rpt6, Rpt4/Rpt5). Rpt2, Rpt3 und Rpt5 können über ihren C-Terminus (HbYX-Motiv) an den proteasomalen  $\alpha$ -Ring binden und die Öffnung der proteasomalen Pore induzieren. Rpn2 bindet das Ubiquitin-bindende Protein Rpn13 und viele Untereinheiten des *lid*. Die nicht-ATPasen des *lid* sind hufeisenförmig angeordnet und besitzen PCI-Domänen, welche die Struktur festigen. Die nicht-ATPasen sind bis auf Rpn11 kaum charakterisiert. Rpn11 besitzt, wie das Ubiquitin-Transport Protein Usp14/Ubp6, eine deubiquitinierende Funktion. Rpn11 dimerisiert mit Rpn8 und assoziiert so mit Rpn10, Rpn3, Rpn9 und Rpn5. Es wird möglicherweise durch das Heterodimer Rpt3/Rpt6 aktiviert (erstellt nach Lasker et al., 2012; Lander et al., 2012).

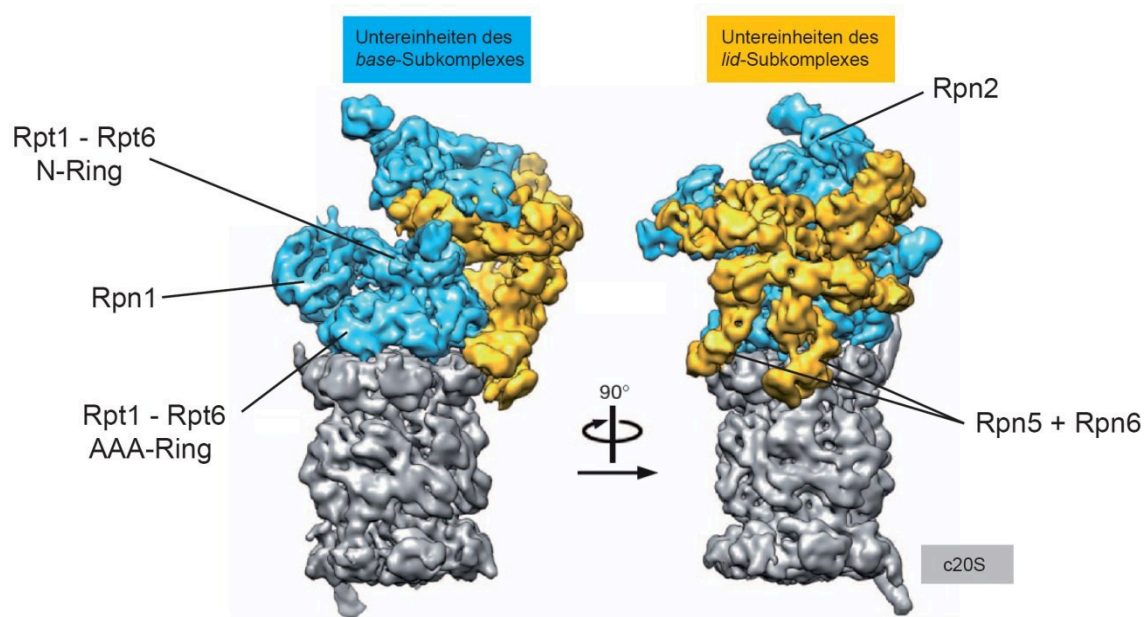
Die dimerisierten N-Termini der ATPasen Rpt1/Rpt2 und Rpt3/Rpt6 können mit Rpn1 und Rpn2 weitere Untereinheiten der *base* binden. Diese beiden nicht-ATPasen bilden ebenfalls ein Dimer und binden diverse Untereinheiten aus beiden Subkomplexen sowie externe Ubiquitinrezeptoren (u.a. Usp14/Ubp6 an Rpn1), die polyUb-Substrate an das Proteasom transportieren (vgl. Abb. 1-4). Die Ubiquitinkette des Substrates kann auf Rpn10 und Rpn13 übertragen werden, die ebenfalls dem basalen Subkomplex zugeordnet werden und unterschiedliche Ubiquitin-Binde-Domänen aufweisen, die jedoch die gleiche Affinität besitzen (Peth et al., 2010; Lander et al., 2012). Der N-Terminus von

Rpn10 weist eine UIM-Domäne (*Ubiquitin-interacting motif*) auf und es ist umstritten, ob dieses Ubiquitin-bindende Protein mit Rpn1 assoziiert ist (Lasker et al., 2012). Der N-Terminus von Rpn13 bindet über die Pru-Domäne (*Pleckstrin-like receptor for ubiquitin*) an K<sup>48</sup>-verknüpftes Diubiquitin und ist parallel mit Rpn2 assoziiert (Husnjak et al., 2008; Lasker et al., 2012). Die ATPase Rpt5 ist als Einzige der sechs ATPasen in der Lage, polymere Ubiquitinketten zu binden, sofern die ATP-Hydrolyse nicht blockiert ist (Lam et al., 2002).

Der *lid* Subkomplex wird aus weiteren nicht-ATPasen (Rpn3, Rpn5-Rpn9, Rpn11 und Rpn12) gebildet und ursprünglich nahm man an, dass der *lid* wie ein Deckel am ATPase-Ring verankert ist. Mittlerweile konnte gezeigt werden, dass die nicht-ATPasen vielmehr zu einem flankierenden Rahmen assemblieren, wodurch die Untereinheiten Rpn5 und Rpn6 auch direkt mit proteasomalen  $\alpha$ -Untereinheiten interagieren können (vgl. Abb. 1-8) (Lander et al., 2012; Lasker et al., 2012).

Funktionell sind die nicht-ATPasen kaum charakterisiert. Eine Ausnahme stellt die Metalloisopeptidase Rpn11 dar, die mit Rpn8 ein Heterodimer bildet. Rpn11 ist ein deubiquitinierendes Enzym (DUB) und besitzt ein JAMM-Motiv (*Jab1/Pad1/MPN metalloenzyme*), welches polymere Ubiquitinketten deassembliert. Sein aktives Zentrum umfasst eine Sequenz aus Glutamat, Histidin und Aspartat, wobei letztere Aminosäuren ein Zn<sup>2+</sup>-Ion binden (Verma et al., 2002). Dieses DUB ist direkt über der proteasomalen Pore lokalisiert und wird möglicherweise von Rpt3/Rpt6 aktiviert. Die Rolle von Rpn8 konnte bislang nicht ermittelt werden (Lasker et al., 2012; Lander et al., 2012).

In humanen Zellen konnten zwei weitere DUBs des 19S Regulators identifiziert werden, die allerdings nur proteasomal assoziiert vorliegen; sie werden nicht als integriert bezeichnet (Liu & Jacobsen, 2012). Usp14 gehört zu der Familie der *ubiquitin specific proteases*; UCH37 ist ein Vertreter von insgesamt vier *ubiquitin c-terminal hydrolases*. Die essentielle Funktion dieser beiden assoziierten DUBs wurde durch den kombinierten *knock down* oder durch die parallele Inhibition von Usp14/Ubp6 und UCH37 unterstrichen. Beide Modulationen führen zu einer Anreicherung von ubiquitinierten Proteinen, was einer dysfunktionalen Proteindegradation entspricht (Liu & Jacobsen 2012).



**Abb. 1-8 Der 19S-20S-Komplex.** Lokalisation des *lid* (gelb) und der *base* (blau) im 26S Holoenzym. Separat hervorgehoben sind der ATPase Doppelring mit sechsfacher Symmetrie des AAA-Rings und den drei Dimeren des N-Rings. Rpn1 bindet an Rpt1/Rpt2. Rpn2 bindet an Rpt3/Rpt6 (Interaktion in der Abbildung nicht gezeigt). Die *lid*-Untereinheiten, in einer hufeisenförmigen Struktur assoziiert, flankieren die Rpt-Untereinheiten. Rpn5 und Rpn6 bilden „Finger“ und binden an  $\alpha 1$  bzw.  $\alpha 2$  (modifiziert nach Lander et al., 2012).

### Ubiquitinvermittelte proteasomale Degradation

Das Öffnen der proteasomalen Pore ist der Schlüsselprozess im Abbau von Proteinsubstraten und bedarf der Interaktion zwischen dem ATPase-Hexamer und dem proteasomalen  $\alpha$ -Heptamer. Die C-terminalen HbYX-Motive dreier ATPasen binden ATP-abhängig an den proteasomalen  $\alpha$ -Ring (vgl. Abb. 1-7) (Lander et al., 2012). Rpt2 und Rpt3 interagieren sehr spezifisch mit der Tasche aus  $\alpha 3/\alpha 4$  und  $\alpha 1/\alpha 2$ , wobei Rpt5 eher unspezifisch in die Tasche von  $\alpha 5/\alpha 6$  oder  $\alpha 6/\alpha 7$  bindet. Rpt2 und Rpt5 bewirken dabei die bereits in Kapitel 1.4. beschriebene Konformationsänderung der proteasomalen Untereinheiten von  $\alpha 2$  -  $\alpha 5$  (Stadtmueller & Hill, 2011; Lander et al., 2012). Rpt3 scheint für die Porenöffnung nicht essentiell zu sein, unterstützt dafür allerdings die 26S Holokomplex-Assemblierung (Kumar et al., 2010). Die so induzierte Öffnung der proteasomalen Pore entspricht einer „Semiaktivierung“, da entfaltete Substrate den  $\alpha$ -

Ring noch nicht passieren können (Bech-Otschir et al., 2009). Peth et al. konnten zeigen, dass eine Aktivierung der ATPasen durch Usp14/Ubp6 und UCH37 ebenfalls zur Porenöffnung beiträgt. Essentiell dabei ist die Bindung des ubiquitinierten Substrates an die externen DUBs (Peth et al., 2013).

Usp14/Ubp6 ist multifunktional, da es, neben der Bindung und Deubiquitinierung von Ubiquitinketten, das markierte Substrat auch an das Proteasom transferiert. Auch andere Transportproteine übertragen die Ubiquitinkette des Substrates an die Ubiquitinrezeptoren Rpn10 und Rpn13 (Peth et al., 2009). Diese beiden Untereinheiten sind im 19S Regulator so lokalisiert, dass ihre Distanz zu Rpn11 der Länge einer Triubiquitinkette entspricht. Während das ubiquitinierte Substrat nun im 19S Regulator aufgespannt ist, vermögen die externen DUBs Usp14/Ubp6 oder UCH37 die polyUb Kette zu trimmen oder das integrierte DUB Rpn11 spaltet die polyUb Kette komplett ab (vgl. Abb. 1-9). Die assoziierten DUBs können dabei durch das Trimmen der Ubiquitinkette eine regulierende Funktion besitzen, die sich positiv oder negativ auf die Degradation auswirkt (Weissman, Shabek & Ciechanover 2011; Liu & Jacobsen 2012). Rpn11 schneidet als Isopeptidase stets zwischen zwei Ubiquitinmolekülen, was erklärt, warum die Substrate mindestens tetraubiquitiniert vorliegen müssen, damit das Protein abgebaut wird. Die Distanz zwischen den Ubiquitinrezeptoren Rpn10/Rpn13 und der Pore des ATPase-Hexamers beträgt 70-80 Å, was die minimale Größe eines Proteinsubstrates von 20 Aminosäuren (etwa 70 Å lang) erklären kann (Lander et al., 2012; Shabek et al., 2012).





proteasomaler Porenöffnung, was durch die Konformationsänderung bei der ATP-Hydrolyse katalysiert wird. Da die ATP-Hydrolyse neben einer entfalteten Domäne des abzubauenen Substrates auch von der gebundenen, währenddessen getrimmten Ubiquitinkette abhängig ist, wird ein unnützer ATP-Verbrauch vermieden (Peth et al., 2013).

Die ATP-Hydrolyse ermöglicht nun die Translokation der entfalteten Substrate in das Innere der proteasomalen Kammer, wo die Aktivität der katalytischen Untereinheiten  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  und  $\beta 5$  durch polyubiquitinierte Substrate um den Faktor zwei gesteigert wird. Dies entspricht einer allosterischen Stimulation, da die Substrate ihre eigene Degradation regulieren. Parallel dazu trägt die Bindung polyubiquitinerter Substrate auch zur 26S/30S-Komplexstabilität bei (Bech-Otschir et al., 2009; Li & DeMartino 2009; Peth et al. 2013).



## 1.6. Zielsetzung der Arbeit

Inflammation und Infektion modulieren das Ubiquitin-Proteasom-System, wodurch die Assemblierung und die Funktion von proteasomalen Komplexen verändert werden kann. Auch unter unstimulierten Bedingungen ist eine Diversität in der Proteasompopulation zu erkennen, welche unter energieökonomischen Aspekten multiple Funktionen erwarten lässt, ein Fakt, der noch nicht vollständig analysiert wurde. Die Hauptfunktion stellt die Ubiquitin-vermittelte Proteindegradation der 19S Regulator assoziierten Proteasomkomplexe dar, die in der Literatur als „26S Proteasom“ zusammengefasst werden.

In der vorliegenden Arbeit sollten deshalb die strukturellen und funktionellen Unterschiede sowie die Relevanz der existierenden Heterogenität von Proteasomkomplexen analysiert werden. Der Fokus lag dabei auf der Diskriminierung des 26S Proteasoms, Hybridproteasoms und 30S Proteasoms.

Durch *in vitro* Studien mit murinen Zelllinien, bei denen eine IFN $\gamma$  Stimulation eine Infektion simuliert, sowie durch *ex vivo* Analysen mit Milz- und Herzgewebe aus C57Bl/6 (WT), LMP2<sup>-/-</sup> und LMP7<sup>-/-</sup> Mäusen sollten folgende Fragestellungen geklärt werden:

- Assemblieren unterschiedliche Zelllinien oder Gewebetypen heterogene Proteasompopulationen?
- Beeinflusst eine IFN $\gamma$  Stimulation die Assoziation von proteasomalen Regulatoren und Aktivatoren an den 20S *core* Komplex und wirkt sich ein Fehlen spezifischer Immununtereinheiten auf die Assoziation von proteasomalen Regulatoren und Aktivatoren aus?
- Weisen die 19S Regulator assoziierten Proteasomtypen 26S, Hybrid und 30S diskontinuierliche oder überschneidende Funktionen in der Ubiquitin-vermittelten Proteindegradation auf?

## 2 Material und Methoden

### 2.1. Geräte und Chemikalien

Die hochreinen Laborchemikalien wurden von AppliChem, Roth, Serva, Sigma Aldrich oder VWR International bezogen. Verbrauchsmaterialien aus Plastik stammten von Greiner, Falcon und Sarstedt.

Gerät	Hersteller
Beckman Optima™ - L	Beckman Coulter
Electrophoretic Power Supply	Amersham Biosciences
Gradient Master IP 107	Biocomp
Hera cell 240	Heraeus
SW 40 Rotor	Beckman Coulter
Synergy™ HT Microplate Reader	BioTek
Thermocycler	Biometra
Thermomixer comfort	Eppendorf
Versadoc Imaging System	Biorad
Zentrifuge 5417R	Eppendorf

Tab. 2-1 verwendete Geräte

### Zellkulturreagenzien

Substanz	Hersteller
DMEM	Biochrom AG
Claycomb Medium	Sigma Aldrich
FCS 0532S	Biochrom AG
FCS F2442	Sigma-Aldrich
Fibronectin	Sigma-Aldrich
Difco™ Gelatin	BD
L-Glutamin	PAA Laboratories GmbH
Interferon $\gamma$ , murin	Roche
ISCOVE	Biochrom AG
Lipofectamin 2000	Invitrogen
MG132	VWR International
Norepinephrin	Sigma Aldrich
OptiMEM	Gibco
Penicillin / Streptomycin	PAA Laboratories GmbH
1x Trypsin	PAA Laboratories GmbH

Tab. 2-2 verwendete Reagenzien für die Zellkultur

sonstige Reagenzien

Substanz oder Material	Hersteller
Acrylamid 4K 30% 37,5:1	AppliChem
<i>Amicon® Ultra Ultracel® – 30K</i>	Millipore
Ampicillin	Roth
<i>ANTI-FLAG® M1 Agarose Affinity Gel</i>	Sigma-Aldrich
ATP	AppliChem
ATP $\gamma$ S	Jena Biosciences
<i>BCA™ Protein Assay</i>	Pierce
<i>Bio-Spin® Disposable Chromatography Columns</i>	BioRad
$\beta$ -Mercaptoethanol	AppliChem
BzVGR-amc	Bachem
<i>Complete® mini</i>	Roche
DTT	Roth
<i>Ecl™ Prime Western Blotting Detection</i>	Amersham Biosciences
Kanamycin	Roth
<i>Monoclonal Anti-HA Agarose Conjugate Clone HA-7</i>	Sigma-Aldrich
<i>NativPAGE™ Novex® 3-12% Bis-Tris-Gel</i>	Invitrogen
NEM	Sigma Aldrich
<i>PageRuler Prestained Protein Ladder</i>	Fermentas
PVDF-Membran	Millipore
<i>Qiagen® Plasmid Maxi Kit</i>	Qiagen
RPX-OMAT Fixierlösung	Kodak
SucLLVY-amc	Bachem
TEMED	Biomol
Whatman Papier	GE Healthcare
<i>Ultra Clear™</i>	Beckman Coulter
X-OMAT Röntgenfilme	Kodak
X-OMAT EX II Entwicklerlösung	Kodak

Tab. 2-3 sonstige, verwendete Reagenzien

## 2.2. Zellbiologische Methoden

### 2.2.1. Zellkultur

#### Zelllinien und Kulturmedien

Bezeichnung	Zelltyp	Kulturmedium
<b>C4</b>	murine Fibroblasten <i>Herkunft: Ulrich Koszinowski</i>	ISCOVE 10% FCS
<b>Raw 264.7</b>	murine Makrophagen (Monocyt) <i>Herkunft: ATCC</i>	ISCOVE 10% FCS
<b>HL-1</b>	murine Kardiomyozyten <i>Herkunft: William C. Claycomb</i>	Claycomb 10% FCS
<b>PA28<sup>-/-</sup> MEF</b>	PA28 $\alpha$ <sup>-/-</sup> PA28 $\beta$ <sup>-/-</sup> murine embryonale Fibroblasten <i>Herkunft: Alice Sijts</i>	ISCOVE 20% FCS
<b>NIH 3T3</b>	Murine embryonale Fibroblasten <i>Herkunft: Charité</i>	DMEM 10% FCS

Tab. 2-4 kultivierte Zelllinien.

<b>ISCOVE-Medium</b>	1% Penicillin/Streptomycin ; 1% L-Glutamin ; 10% bzw. 20% FCS 0532S
<b>DMEM-Medium</b>	1% Penicillin/Streptomycin ; 1% L-Glutamin ; 10% FCS 0532S
<b>Claycomb-Medium</b>	1% Penicillin/Streptomycin ; 1% L-Glutamin ; 0.1mM Norepinephrin ; 10% FCS F2442 (Sigma Aldrich)
<b>Ca<sup>2+</sup> Mg<sup>2+</sup> freies Medium</b>	140mM NaCl ; 2.7mM KCl ; 8mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O ; 1.5mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 80 $\mu$ M EDTA ; 0,5% Phenolrot ; sterilfiltriert

Die adhärenenten Zellen wurden in sterilen Zellkulturschalen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Erreichte der Zellrasen eine Konfluenz von etwa 90% wurden die Zellen mit erwärmtem Ca<sup>2+</sup> Mg<sup>2+</sup> freiem Medium abgelöst und ihrer Wachstumsrate entsprechend in eine neue Zellkulturschale umgesiedelt.

Die Kardiomyozytenzelllinie HL-1 wurde uns von Dr. William Claycomb zur Verfügung gestellt und in Claycomb-Medium kultiviert. Die Zellen wurden mit erwärmter

Trypsinlösung abgelöst, bei 1200rpm/3min/RT zentrifugiert und anschließend neu ausgesät. Die Zellkulturschale musste zuvor mit einer Lösung aus 0,02% Gelatine und 0,6% Fibronektin inkubiert werden. Nach 8h wurde die Lösung abgesaugt und die nun beschichtete Zellkulturschale wurde mit Claycomb-Medium gefüllt, welches lichtgeschützt aufbewahrt wurde.

## Einfrieren und Auftauen

<b>Kryomedium</b>	20% FCS ; 10% DMSO im entsprechendem Medium
-------------------	---

Zum Einfrieren der Zellen wurden diese von der Zellkulturplatte gelöst, bei 1200rpm/3min/RT zentrifugiert und in Kryomedium resuspendiert. Das langsame Einfrieren erfolgte bei -80°C in einer mit Isopropanol gefüllten Kryobox. Zur Lagerung wurden die Kryoröhrchen in Flüssigstickstoff umgesetzt.

Zum Auftauen wurde das Kryoröhrchen im Wasserbad bei 37°C zügig aufgetaut und in einer Zellkulturschale ausplattiert. Nach vollständiger Adhäsion der Zellen wurde das Zellkulturmedium gewechselt.

### Zellstimulation mit dem Cytokin IFN $\gamma$

**1x PBS** 140mM NaCl ; 2.7mM KCl ; 6,5mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ; 1.5mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

Zur Simulation einer Infektion wurden die Zellen mit murinem IFN $\gamma$  stimuliert. Die Inkubation der Zellen erfolgte mit 50 U/ml IFN $\gamma$ . Die Zellen wurden nach den angegebenen Zeitpunkten geerntet und nach dem Ablösen bei 1200rpm/3min/RT zentrifugiert. Das Pellet wurde mit gekühlter und steriler 1x PBS-Lösung gewaschen, in ein 1,5ml Eppendorfgefäß überführt und abschließend erneut bei 8000rpm/3min/4°C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde bis zur Lyse bei -80°C gelagert.

## Transfektion

Die transiente Transfektion von NIH 3T3 Zellen mit den angegebenen Expressionsplasmiden (vgl. Tab 2-5) erfolgte mit *Lipofectamin 2000*. Den Herstellerangaben entsprechend wurden pro 15cm-Zellkulturschale folgende Mengen eingesetzt:

- 45µl Lipofectamin 2000 in 955µl OptiMEM Transfektionsmedium
- 25µg DNA pro Plasmid in insgesamt 1000µl OptiMEM Transfektionsmedium

Die Inkubation erfolgte für 5h in 8ml OptiMEM. Danach erfolgte ein Mediumswechsel zu DMEM 10% FCS.

## 2.3. Mausmodell

Für die Analyse von murinem Herz- und Milzgewebe wurden die Organe aus drei verschiedenen Mausstämmen verwendet. C57BL/6 Wildtypmäuse und LMP2<sup>-/-</sup> sowie LMP7<sup>-/-</sup> Mäuse wurden gemäß den Bestimmungen des Deutschen Tierschutzgesetzes im Tierstall der Charite Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin, gehalten (Genehmigungsnummer G0311/06, Antje Voigt). Nach der Tötung erfolgte die Organentnahme, welche zur Aufbewahrung im Flüssigstickstoff schock gefroren wurden und bei -80°C aufbewahrt wurden.

## 2.4. Molekularbiologische Methoden

### 2.4.1. Plasmid *Maxi Prep*

Plasmidbezeichnung	Kodiertes Protein	Resistenz
pEGFP HA Ubi	Ubiquitin – HA	Kanamycin
pCDNA 3.1. IκBα-flag	IκBα - flag	Ampicillin

Tab. 2-5 verwendete Plasmide

**LB-Medium** 0.005% Hefe Extrakt [w/v] ; 0.01% Bacto-Trypton [w/v] ; 100mM NaCl

Für die Aufreinigung von Expressionsplasmiden wurden zunächst 200ml LB-Medium und 100µg/ml Ampicillin bzw. Kanamycin mit Bakterien aus dem Glycerolstock angeimpft. Die Kultivierung erfolgte schüttelnd bei 37°C/ÜN. Für die Aufreinigung wurde der Kit *Qiagen Maxi Prep* den Herstellerangaben entsprechend verwendet.

Die Konzentration der aufgereinigten Expressionsplasmide wurde mittels photometrischer Bestimmung bei einer Wellenlänge von 260nm bestimmt.

## 2.5. Biochemische Methoden

### 2.5.1. Herstellung von Zell- und Gewebelysaten

**TSDG-Lysepuffer**    10% Glycerol ; 10mM Tris/HCl pH 7.0 ; 25mM KCl ; 10mM NaCl ;  
1.1mM MgCl<sub>2</sub> ; 1mM DTT

Die eingefrorenen Zellpellets wurden auf Eis aufgetaut und in Lysepuffer resuspendiert. Nach zehnminütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen abwechselnd fünfmal in Flüssigstickstoff und ein 25°C heißes Wasserbad getaucht. Die anschließende Zentrifugation bei 14000rpm/25min/4°C trennte Zellreste vom Proteinlysate ab.

### Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Analyse der Proteinkonzentration erfolgte mittels *BCA protein assay kit* und entsprechend der Herstellerangaben. Die Proteinkonzentration wurde durch die photometrische Erfassung der Messwerte und korrespondierender Auswertung einer BSA abhängigen Eichkurve errechnet. Die Errechnung der Konzentrationswerte erfolgte über Microsoft Excel.

### 2.5.2. Gelelektrophorese

Zur Analyse von Proteinen und Proteinkomplexen wurden unterschiedliche Methoden der Gelelektrophorese angewandt.

#### SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

**Sammelgel**    5% Acrylamid ; 125mM Tris/HCl pH 6.8 ; 0.1% SDS ; 0.05% APS ; 0.03% TEMED

**Trenngel**    8-15% Acrylamid ; 375mM Tris/HCl pH 8.8 ; 0.1% SDS ; 0.05% APS ;  
0.03% TEMED

**10x SDS-Probenpuffer**    50mM Tris/HCl pH 6.8 ; 1.6% SDS ; 4% Glycerol ; 0.6% β-Mercaptoethanol ; Bromphenolblau

**1x SDS-Laufpuffer**    25mM Tris ; 200mM Glycin ; 0.1% SDS

Jedes Gel wurde mit 10µg Protein/Spur beladen. Das Proteinlysate wurde entsprechend aliquotiert und mit 10x SDS-Probenpuffer versetzt. Dieser Ansatz wurde für 5min/95°C erhitzt, anschließend bei 3000rpm/3min/RT zentrifugiert.

Nach dem Beladen des Gels mit Lysat und Proteinmarker elektrophorierte es bei 140V/90min oder bis zur gewünschten Auftrennung in 1x SDS-Laufpuffer.

### Western Blot

**SemiDry Western Blot Puffer**      25mM Tris ; 200mM Glycin ; 20% MetOH

**Coomassie-Färbe-Lösung**      10% Essigsäure ; 30% MetOH ; 0.1% Coomassie brilliant blue R250

**Entfärber**      50% MetOH bzw. 100% MetOH

Mittels des SemiDry Western Blot Verfahrens wurden die Proteine bei 400mA/60min aus dem Gel auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran transferiert. Um den erfolgreichen Transfer zu verifizieren, wurde die Membran für ein paar Minuten in Coomassie-Färbe-Lösung geschwenkt, bevor die Membran mit 50% Methanol entfärbt wurde. Die vollständige Entfärbung erfolgte mit 100% Methanol.

### native Gelelektrophorese

**1x BisTris-Puffer**      50mM BisTris ; 50mM Tricin

**5x nativ Probenpuffer**      10% Glycerol ; Bromphenolblau

**Substratpuffer**      30mM Tris/HCl pH 7.5 ; 10mM KCl ; 5mM MgCl<sub>2</sub> ; 10% Glycerol

Die native Gelelektrophorese ermöglicht eine Separierung von Proteinkomplexen gemäß ihrer Größe, Form und natürlichen Ladung und gewährt zudem die Erhaltung der Struktur und Funktion. Es wurden zwei verschiedene Varianten von nativen Gelen verwendet, die beide im gleichen Puffersystem (1x BisTris-Puffer) elektrophoriert wurden.

#### NativPAGE™ Novex® 3-12% Bis-Tris-Gel von INVITROGEN

Dieses kommerzielle Gel wurde mit 10-40µg Proteinlysate beladen und bei 150V/240min bei 4°C elektrophoriert.



### 4% bzw. 4,5% Acrylamid homogene native PAGE

**Nativgel**      3.2% Glycerol ; 0.4% 10x BisTris-Puffer ; 0.4mM DTT ; 0.075% APS ; 0.2% TEMED ; 4% bzw. 4,5% Acrylamid

Dieses selbstgemachte Gel wurde ebenfalls mit 10-40µg Proteinlysats/Spur beladen und bei 150V/195-300min/4°C elektrophoriert. Die Konzentration des eingesetzten Acrylamids musste an die jeweilige Charge der Acrylamid-Lösung angepasst werden. Als Größenorientierung diente aufgereinigtes 20S Proteasom aus Mausgewebe.

Für die Visualisierung der proteasomalen Komplexe wurde der sogenannte *Overlay*-Assay angewandt. Dabei wird Substratpuffer mit 200µM SucLLVY-amc hergestellt, um die chymotryptische Aktivität der proteasomalen Komplexe zu messen. Das dabei freiwerdende 8-acetyl-7-hydroxy-4-methylcoumarin fluoreszierte, wenn es im *Versadoc Imaging System* mit UV-Licht oder auf dem UV-Tisch angeregt wurde.

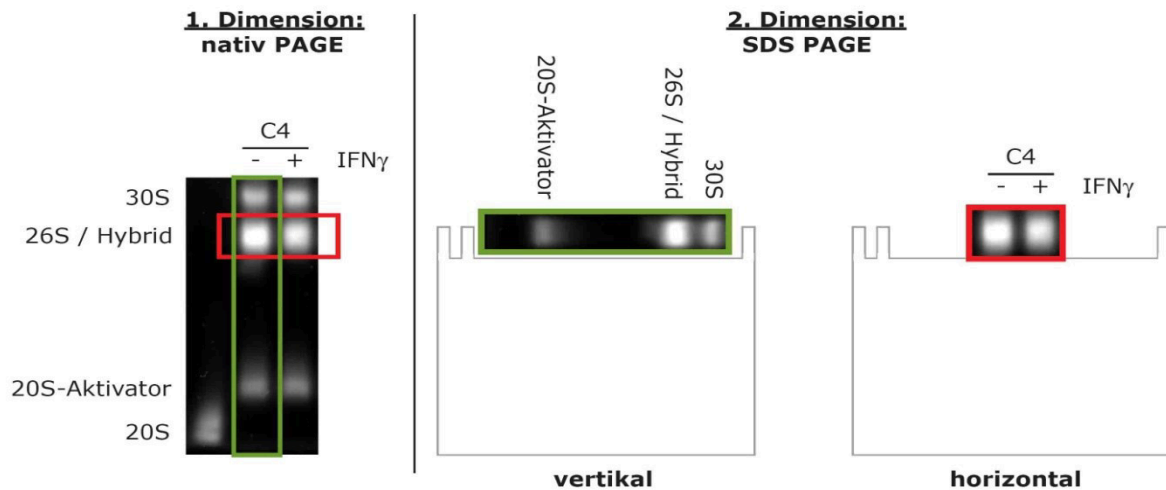
### Western Blot von nativen Gelen

**Nassblot-Puffer**      1x SDS-Laufpuffer ; 20% MetOH

Die im nativen Gel separierten Proteinkomplexe wurden mittels Nassblotverfahren (10V/ÜN/4°C) auf eine PVDF-Membran transferiert. Das Nativgel quellte vor der Elektrophorese für 30min/RT im Nassblotpuffer. Abschließend wurde der erfolgreiche Transfer mittels einer Coomassie-Färbung überprüft.

## **2.5.3. Horizontale und vertikale native 2D PAGE**

Für eine native 2D PAGE wurden in einem 4% oder 4,5% Acrylamid homogenen Nativgel (1,5mm Dicke) zunächst 80µg Proteinlysats/Spur aufgetrennt. Nach dem Substratoverlay konnten die fluoreszierenden Banden, die proteasomalen Komplexe kennzeichnend, ausgeschnitten werden. Das Ausschneiden der Banden erfolgte entweder horizontal oder vertikal (vgl. Abb. 2-1).



**Abb. 2-1 Prinzip der nativen 2D PAGE in horizontaler und vertikaler Ausrichtung.** 80µg Proteinlysate wurde auf einem 4% AA nativen Gel bei 150V/195min/4°C elektrophoriert. Für die anschließende SDS-Gelelektrophorese in zweiter Dimension wurden Banden horizontal (rot) oder vertikal (grün) ausgeschnitten. Die Banden müssen vor der weiteren Auftrennung in 1% SDS/β-Mercaptoethanol inkubiert werden. Das Sammelgel eines SDS-Gels wurde modifiziert, um die Gelbande zu platzieren. Bei der anschließenden Elektrophorese mit 140V/90min können die einzelnen Proteine gemäß der SDS-PAGE aufgetrennt werden. Eine Immundetektion mit sämtlichen Antikörpern ist nun möglich.

Um die im Gelfragment enthaltenen Proteine zu denaturieren, wurden diese in einer Lösung aus 1% SDS und 1%  $\beta$ -Mercaptoethanol bei 60min/RT inkubiert und anschließend ohne Lösung eingefroren.

Die Auftrennung in der zweiten Dimension erfolgte über die 15%, 12.5% oder 8% AA SDS-PAGE, indem das denaturierte und noch gefrorene Fragment waagrecht oder vertikal in eine modifizierte Tasche gelegt wurde. Die SDS-PAGE und der anschließende Western Blot wurden wie zuvor beschrieben durchgeführt (vgl. Kap. 2.5.2).

### 2.5.4. Immundetektion

Antikörper	Typ ; Wirt	Quelle
$\alpha 4$	primär ; Kaninchen	AG Kloetzel
$\beta 1$	primär ; Kaninchen	AG Kloetzel
CCT $\epsilon$	primär ; Kaninchen	ptg lab
HA	primär ; Maus	Covance
I $\kappa$ B $\alpha$	primär ; Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology Inc.
LMP2	primär ; Kaninchen	AG Kloetzel
LMP7	primär ; Kaninchen	AG Kloetzel
MECL-1	primär ; Kaninchen	AG Kloetzel
MP3	primär ; Kaninchen	AG Kloetzel
PA28 $\alpha$	primär ; Kaninchen	AG Kloetzel
PA28 $\beta$	primär ; Kaninchen	AG Kloetzel
Rpn2	primär ; Maus	Enzo Life Science
Rpt8	primär ; Maus	Enzo Life Science
PA200	primär ; Kaninchen	Thermo Scientific
rb $\alpha$ ms	sekundär ; Kaninchen	Dianova
gt $\alpha$ rb	sekundär ; Ziege	Calbiochem

Tab. 2-6 Antikörper.

**Blockierlösung**      5% Magermilchpulver in 1x PBS-T

**PBS-T**                      1x PBS ; 0.1% Tween-20

Für die Detektion von spezifischen Proteinen auf der Membran wurde die entfärbte Membran zunächst für 60min/RT in der Blockierlösung geschwenkt. Anschließend erfolgte die Inkubation im primären Antikörper, der in der Blockierlösung verdünnt wurde. Die Inkubation des primären Antikörpers erfolgte ÜN/4°C oder 120min/RT. Die Liste der verwendeten Antikörper ist in Tab. 2-6 aufgeführt. Die jeweiligen Antikörperversdünnungen sind in den Abbildungsbeschreibungen angegeben.

Der sekundäre, Meerrettich-Peroxidase gekoppelte Antikörper (s. Tab 2-6) wurde ebenfalls in der Blockierlösung verdünnt und diente zur weiteren Inkubation der Membran, nachdem diese dreimal für 10min in PBS-T gewaschen wurde. Abschließend wurde die Membran erneut mit PBS-T gewaschen, nun dreimal für 15min.

Zur Detektion der peroxidasevermittelten Chemilumineszenz wurde das *ECL Plus Western Blotting Reagent* nach Herstellerangaben verwendet.

Der lichtempfindliche Film X-OMAT wurde unterschiedlich lang exponiert und anschließend mit X-OMAT EX II Entwicklerlösung und RPX-OMAT Fixierlösung behandelt.

### 2.5.5. Separation der Proteasompopulation

Für die separate Analyse der einzelnen proteasomalen Komplexe wurde Proteinlysate über einen Dichtegradienten aufgereinigt.

#### 20% - 40% Glyceroldichtegradient

**20% Glycerolgradientenlösung**      20% Glycerol ; 10mM Tris/HCl pH 7.0 ; 25mM KCl ; 1.1mM MgCl<sub>2</sub>

**40% Glycerolgradientenlösung**      40% Glycerol ; 10mM Tris/HCl pH 7.0 ; 25mM KCl ; 1.1mM MgCl<sub>2</sub>

Die Lösungen des 20 bis 40% Glyceroldichtegradienten wurden in *Ultra Clear*<sup>TM</sup> Zentrifugenröhrchen für den SW40 Rotor unterschichtet und im Gradientenmischer *Gradient Master IP 107* zu einem linearen Gradienten vermischt. Der Gradient wurde mit 3mg bis 5mg Proteinlysate überschichtet und bei 40000rpm/20h/4°C zentrifugiert.

#### Fraktionieren und Aktivitätsbestimmung

**Substratpuffer**                      30mM Tris/HCl pH 7.5 ; 10mM KCl ; 5mM MgCl<sub>2</sub> ; 10% Glycerol

**Substrate**                          40µM SucLLVY-amc (Anregung der chymotryptischen Aktivität)

Das Fraktionieren des Gradienten erfolgte manuell zu 500µl Aliquots und ergab insgesamt 25 Fraktionen. Die Verteilung der Proteasompopulation wurde über eine Aktivitätsbestimmung gemessen. Hierzu versetzte man je 100µl Substratpuffer mit 40µM Substrat Suc-LLVY-amc und 10µl Fraktion. Die Inkubation erfolgte lichtgeschützt für 30min/37°C. Die Analyse der fluorogenen Gruppe (s. auch 2.5.2) erfolgte durch Anregung bei einer Wellenlänge von 360nm und Messung der Emission bei einer Wellenlänge von 460nm. Die Darstellung der Werte erfolgte in einem graphischen Kurvenverlauf, der in Microsoft Excel errechnet wurde.

#### native Gelelektrophorese der Gradientenfraktionen

Um die Verteilung der proteasomalen Komplexe im Glyceroldichtegradienten zu visualisieren wurden 350µl Fraktion mittels *Amicon® Ultra Ultracel® - 30K* Zentrifugenröhrchen auf ein Endvolumen von 50µl konzentriert (4000rpm/40min/4°C). Das Konzentrat wurde mit 10µl nativ Probenpuffer versetzt und zügig auf ein 4.5% Acrylamid homogenes Nativgel aufgetragen. Die Elektrophorese und der Substratoverlay erfolgten wie unter 2.5.2 beschrieben.

### 2.5.6. Immunpräzipitation

**IP-Waschpuffer**                      20% Glycerol ; 10mM MgCl<sub>2</sub> ; 25mM Hepes pH 7.2

Für die Analyse von proteasomal assoziierten Proteinen, wurde das Totallysat der Raw264.7 Makrophagen ähnlichen Zellen mit 2µl K08, ein Antikörper der murines 20S erkennt, inkubiert. Die rotierende Inkubation erfolgte bei 4°C/ÜN. Zur Präzipitation wurden 100µl *beads* von *nProtein A Sepharose™ 4 Fast Flow* (GE Healthcare) verwendet. Vor der Zugabe des Lysat-Antikörper-Gemisches wurden die *beads* zweimal mit TSDG-Lysepuffer gewaschen: Resuspendieren in 1ml Lysepuffer und anschließende Zentrifugation bei 5000rpm/5min/4°C. Das Lysat-Antikörper-Gemisch wurde zu den *beads* pipettiert und anschließend bei 4°C/5h rotierend inkubiert. Die *beads* wurden danach in IP-Waschpuffer resuspendiert, für 5min/RT rotiert und bei 5000rpm/5min/4°C zentrifugiert. Dieser Zyklus wurde fünfmal wiederholt. Der jeweils entstehende Überstand wurde mittels einer Pipette abgesaugt. Nach dem Waschen wurden präzipitierte Proteine mittels 50µl 10x SDS-Probenpuffer von den *beads* abgelöst. Es folgte eine Inkubation bei 95°C/5min und eine Zentrifugation bei 3000rpm/3min/RT und eine abschließende SDS PAGE.

#### Immunpräzipitation der Gradientenfractionen

Für die Immunpräzipitation aus Gradientenfractionen wurden 300µl der Fraktion mit 2µl Antikörper K08 inkubiert. Die nachfolgenden Schritte wurden wie unter 2.5.6 beschrieben durchgeführt.

### 2.5.7. Massenspektrometrische Analyse von Proteinbanden

Für eine massenspektrometrische Analyse wurde 80µg Zelllysate von Raw264.7 Makrophagen auf einer NativPAGE™ Novex® 3-12% Bis-Tris-Gel von INVITROGEN aufgetragen (vgl. Kapitel 2.5.2.). Des Weiteren wurden Proben, die aus einer Co-Immunpräzipitation gewonnenen wurden (vgl. Kapitel 2.5.6.), auf ein SDS Gel aufgetragen. Das SDS Gel wurde anschließend entweder per Western Blot für eine Immundetektion verwendet oder gleich mit Coomassie gefärbt, um eine massenspektrometrische Analyse zu ermöglichen, die von Agathe Niewianda und Katharina Janek, Institut für Biochemie, Charité Berlin, durchgeführt wurden.

### 2.5.8. Elektronenmikroskopische Aufnahmen

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen erfolgten durch eine Kooperation mit Elmar Behrmann und Christian Spahn, Institut für medizinische Physik und Biophysik, Charité Berlin und der AG Thorsten Mielke am Max Planck Institut für molekulare Genetik, Berlin.

**Hepes-Lysepuffer**    10% Glycerol ; 10mM Hepes pH 7.2 ; 25mM KCl ; 10mM NaCl ;  
1.1mM MgCl<sub>2</sub> ; 1mM DTT

**10% Sucrosegredientenlösung**    10% Sucrose ; 10mM Hepes/HCl pH 7.2 ; 25mM KCl ;  
1.1mM MgCl<sub>2</sub>

**40% Sucrosegredientenlösung**    40% Sucrose ; 10mM Hepes/HCl pH 7.2 ; 25mM KCl ;  
1.1mM MgCl<sub>2</sub>

**+/- 0,1% Glutaraldehyd**

**Gradientenlösung**    10mM Hepes/HCl pH 7.2 ; 25mM KCl ; 1.1mM MgCl<sub>2</sub>

Für die Verifizierung der proteasomalen Assoziation von TRiC wurden elektronenmikroskopische Bilder aufgenommen.

Die Vorbereitung der Proben weicht von dem allgemeinen Aufreinigungsprotokoll ab, da es an eine Verwendung von Glutaraldehyd angepasst werden musste:

Die Makrophagenzelllinie Raw264.7 wurde wie unter 2.2.1. protokolliert kultiviert und nach der Ernte in Hepes-Lysepuffer resuspendiert. Die verbleibenden Schritte der Lyse verliefen wie unter 2.5.1. beschrieben. Für die Gradientenzentrifugation wurden 5mg Proteinlysate verwendet.

Die Auftrennung der proteasomalen Population erfolgte über eine Dichtegradientenzentrifugation in 10-40% Sucrose. Zur Stabilisation der eventuellen Assoziation zwischen TriC und Proteasom wurde der 40% Sucroshaltigen Gradientenlösung 0.1% Glutaraldehyd zugesetzt (Kastner et al., 2008). Die Zentrifugation verlief bei 22500rpm/14h/4°C.

Die anschließende Fraktionierung erfolgte zu Fraktionen mit einem Volumen von 250µl. Ein Kontrollansatz, der ohne die Zugabe von Glutaraldehyd gefahren wurde, konnte parallel für eine Aktivitätsmessung verwendet werden. Dies kann den korrekten Verlauf der Gradientenzentrifugation bestätigen und auf den Ansatz mit 0,1% Glutaraldehyd übertragen werden.

Die mit Glutaraldehyd fixierten Fraktionen wurden für die elektronenmikroskopische Analyse verwendet. Zur Minderung der Sucrosekonzentration wurden 45µl Probe auf eine 0,25µm Membran (Millipore) pipettiert. Die Membran schwamm auf einer gekühlten Petrischale, welche mit 20ml Gradientenlösung gefüllt war. Innerhalb einer zweistündigen Inkubation konnte so die Sucrosekonzentration vermindert werden. Je nach Konzentration der Probe, aus der elektronenmikroskopischen Aufnahme „*negative*

*stain*“ ersichtlich, kann diese Probe noch 1:1 mit Gradientenlösung verdünnt werden. Diese Probenaufbereitung ermöglicht ein *negative stain*, sowie die Präparation von Cryo-Grids. Beide Methoden wurden durch Jörg Bürger, AG Thorsten Mielke, MPI für Molekulare Genetik durchgeführt.

## 2.5.9. Messung der proteasomalen Degradation

### Generierung der Substrate HA-Ubi-IκBα-flag und flag-IκBα-Ubi-flag

**RIPA-Lysepuffer**                      50mM Tris pH 7.8 ; 10% Glycerol ; 150mM NaCl ; 1% Triton-X ;  
0.025% Natriumdeoxycholat ; 1mM EDTA

**Inhibitoren**                              10mM NEM ; 10μM MG132 ; 1x Complete® mini

**0.1M Glycin/HCl pH 2.5**

**1x PBS**

**0.5M Tris pH 10.6 ; 50x *complete* mini**

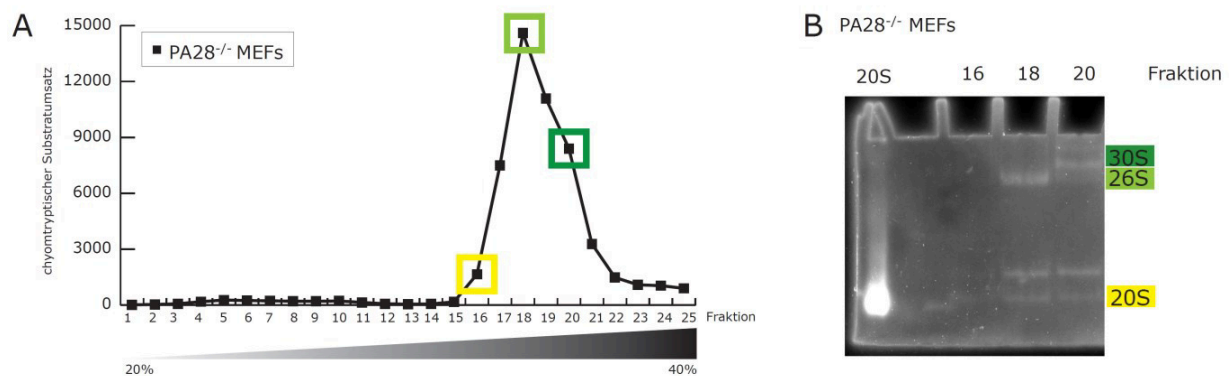
Zur Analyse der Degradationseffizienz einzelner proteasomaler Komplexe wurde ein ubiquitiniertes Protein als Substrat generiert: rekombinantes IκBα-flag wurde intrazellulär mit rekombinantem HA-Ubiquitin verknüpft. Die einzelnen rekombinanten Proteine werden über je einen Vektor kodiert (vgl. Tab. 2-5), wobei beide in NIH3T3 Fibroblasten kotransfiziert wurden (vgl. 2.2.1). Eine anschließende Purifikation konnte über den HA-*tag* des Ubiquitins oder den flag-*tag* von IκBα erfolgen, wodurch die Substrate HA-Ubi-IκBα-flag bzw. flag-IκBα-Ubi-HA entstehen.

Transient kotransfizierte NIH3T3 Fibroblasten wurden in RIPA-Lysepuffer (Zellpellet aus drei 15cm-Zellkulturschalen in 400μl RIPA-Lysepuffer) resuspendiert. Nach einer zehnminütigen Inkubation auf Eis wurde die Zellsuspension bei 14000rpm/15min/4°C zentrifugiert. Der komplette Überstand wurde mit 75μl *Monoclonal Anti-HA Agarose Conjugate Clone HA-7* „HA-beads“ (Sigma-Aldrich) oder *ANTI-FLAG ® M1 Agarose Affinity Gel* „flag-beads“ (Sigma-Aldrich) bei 4°C/ÜN rotierend inkubiert. Anschließend wurde das Lysat-beads-Gemisch auf *Bio-Spin Disposable Chromatography Columns* (BioRad) geladen, dreimal mit 1ml 1x PBS gewaschen und anschließend mit 300μl 0,1M Glycin/HCl pH 2,5 eluiert. Zuvor wurden im Auffanggefäß 75μl 0,5M Tris pH 10,6 und 7,5μl Complete ® mini vorgelegt, um den pH-Wert unverzüglich auszugleichen. Das nun eluierte Protein wird der gewählten Purifikationsmethode entsprechend bezeichnet. Die Verwendung des Substrates sollte sich auf die unverzügliche Benutzung beschränken, da die Haltbarkeit zwei Wochen beträgt.



## Aufreinigung der proteasomalen Komplexen 20S, 26S und 30S

Um die Effizienz unterschiedlicher proteasomaler Komplexe zu analysieren, müssen die einzelnen Komplexe voneinander getrennt werden. Dies erfolgte über die Dichtegradientenzentrifugation (vgl. 2.5.5). Die Trennung der proteasomalen Komplexe wurde mittels nativer Gelelektrophorese kontrolliert (vgl. Abb. 2-2).



**Abb. 2-2 A Aktivitätsprofil der Dichtegradientenfraktionen und B 4,5% AA natives Gel mit Gradientenfraktionen aus PA28<sup>-/-</sup> MEFs.** A: 3mg Totallysat aus PA28<sup>-/-</sup> MEFs wurden über einen 20-40% Glycerolgradienten aufgetrennt. Die einzelnen Fraktionen wurden mit Suc-LLVY-amc Substrat inkubiert. Der Graph zeigt die Emissionswerte der einzelnen Fraktionen mit einer Wellenlänge von 460nm. B: 50µl der ausgewählten Fraktion wurden bei 150V/195min/4°C elektrophoriert. Anschließender *Overlay*-Assay zeigt unter UV-Licht die mögliche Auftrennung zwischen 20S, 26S und 30S in den unterschiedlichen Fraktionen.

Die Auswahl der einzelnen Fraktionen erfolgte über die Messung der proteasomalen Aktivität (vgl. Abb. 2-2A) (vgl. 2.5.5). Das Aktivitätsprofil zeigt einen Maximalwert, der als 26S (Fraktion 18) identifiziert werden konnte. Etwa zwei Fraktionen in die höhere Dichte verschoben lässt sich das 30S erkennen (Fraktion 20).

## In-vitro Degradation der Substrate durch 20S, 26S und 30S

**Substratpuffer** 30mM Tris/HCl pH 7.5 ; 10mM KCl ; 5mM MgCl<sub>2</sub> ; 10% Glycerol  
2mM ATP bzw. 2mM ATP<sub>γ</sub>S

**Substrate** HA-Ubi-IκBα-flag ; flag-IκBα-Ubi-HA

**Inhibitoren** 2nM Epoxomicin (irreversibler Inhibitor der β-Untereinheiten)  
10µM MG132 (reversibler Inhibitor der β-Untereinheiten)  
10mM NEM (Inhibitor der Deubiquitinierung)  
5mM O'-Phenanthrolin (Inhibitor der Deubiquitinierung)

Der *in vitro* Abbau von HA-Ubi-IκBα-flag oder flag-IκBα-Ubi-HA wurde in einem Gesamtvolumen von 50µl durchgeführt. Der Substratpuffer enthielt 2mM ATP und wurde mit 10µl der Dichtegradienten-Fraktion sowie mit 2µl ubiquitiniertem Substrat für



unterschiedliche Zeitpunkte inkubiert. Als Kontrolle dienten Fraktionen, die vorab für 10min mit 10 $\mu$ M MG132, 2nM Epoxomicin, 10mM NEM oder 5mM O-Phenanthrolin inhibiert wurden bzw. Substratpuffer, der mit 2mM ATP $\gamma$ S versetzt wurde. Die vorangehende Inkubation einer Fraktion mit 10U/ml Apyrase erfolgte für 3h/37°C. Der Verdau wurde durch die Zugabe von 10 $\mu$ l 10x SDS-Probenpuffer und dem Kochen bei 95°C/5min beendet. Die Grundlage des Degradationsansatzes aus Substratpuffer und Substrat wurde als Mastermix angesetzt und anschließend in weitere Mastermixansätze aufgeteilt, die für die einzelnen Fraktionen verwendet wurden. Dies ermöglichte, dass jeder Degradationsansatz die vergleichbare Menge an Substrat enthielt.

Die Abbaurate wurde mittels SDS-PAGE ermittelt und per densitometrischer Analyse (Intensitäten:  $I_{\text{IkB}\alpha}/\alpha 4$ ) verifiziert. Als Vergleichswert wurde der Ansatz mit NEM gewählt, da die destabilisierende Wirkung dieses Inhibitors auf 26S und 30S Proteasom zu dem höchsten densitometrischen Wert von  $I_{\text{IkB}\alpha}$  führte.

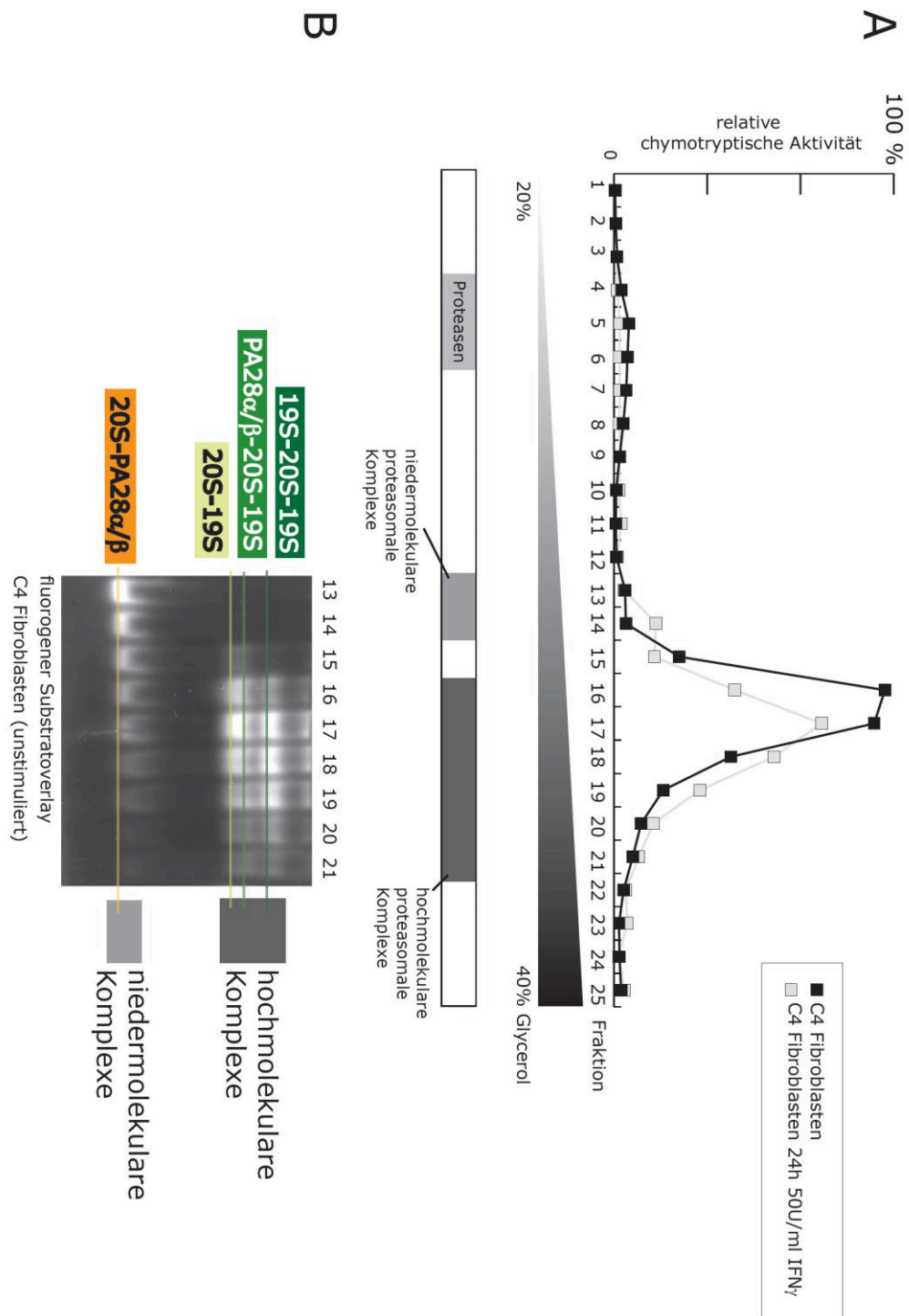
## 3 Ergebnisse

### 3.1. Charakterisierung der proteasomalen Komplexe

In einer Zelle werden unterschiedliche Proteasomkomplexe assoziiert, die diverse Funktionen erfüllen. Zur Analyse dieser strukturellen Vielfalt wurde die murine Fibroblastenzelllinie C4 verwendet. Mit Hilfe der Gradientenzentrifugation in 20 - 40% Glycerol können sämtliche Proteine und Proteinkomplexe ihrem Sedimentationskoeffizienten entsprechend aufgetrennt werden. Die Messung der chymotryptischen Aktivität der einzelnen Gradientenfraktionen ergibt einen Aktivitätsgraphen, aus dem die proteasomalen Komplexe zugeordnet werden können (vgl. Abb. 3-1A). Werden die Fraktionen anschließend mittels nativer Gelelektrophorese aufgetrennt, lässt sich die Assoziationen zwischen 20S *core* und dem 19S Regulator sowie den proteasomalen Aktivatoren aus dem elektrophoretischen Laufverhalten ableiten (vgl. Abb. 3-1B).

In Abb. 3-1 A erkennt man den Umsatz des fluorogenen Substrates Suc-LLVY-amc. Das Zelllysate von nicht IFN $\gamma$  stimulierten C4 Fibroblasten lässt, mit Ausnahme von Fraktion 14, einen insgesamt höheren chymotryptischen Substratumsatz als das Zelllysate von IFN $\gamma$  stimulierten Fibroblasten erkennen.

Die Fraktionen 5 bis 8 enthalten niedermolekulare Proteasen (vgl. Abb. 3-1A). Dabei handelt es sich um Aminopeptidasen, die das Substrat Suc-LLVY-amc ebenfalls spalten können. Ab Fraktion 13/14 lässt sich der 20S *core* Komplex detektieren, welcher ein Molekulargewicht von ca. 700 kDa aufweist. Dieses 20S Proteasom kann mit dem PA28 $\alpha/\beta$  Aktivator oder dem PA200 Aktivator assoziiert sein. Diese Gruppe an proteasomalen Komplexen wird in der vorliegenden Arbeit unter dem Begriff „Aktivator assoziiertes 20S Proteasom“ zusammengefasst.



**Abb. 3-1 Proteasompopulation der murinen Fibroblastenzelllinie C4.** **A** chymotryptischer Aktivitätsgraph nach Gradientenzentrifugation von dem Lysat unstimulierter und IFN $\gamma$  stimulierter C4 Fibroblasten. Proteasen = nicht proteasomale Proteasen. **B** Die native PAGE der Fraktionen 13 bis 21 mit anschließendem chymotryptischen Substratoverlay.

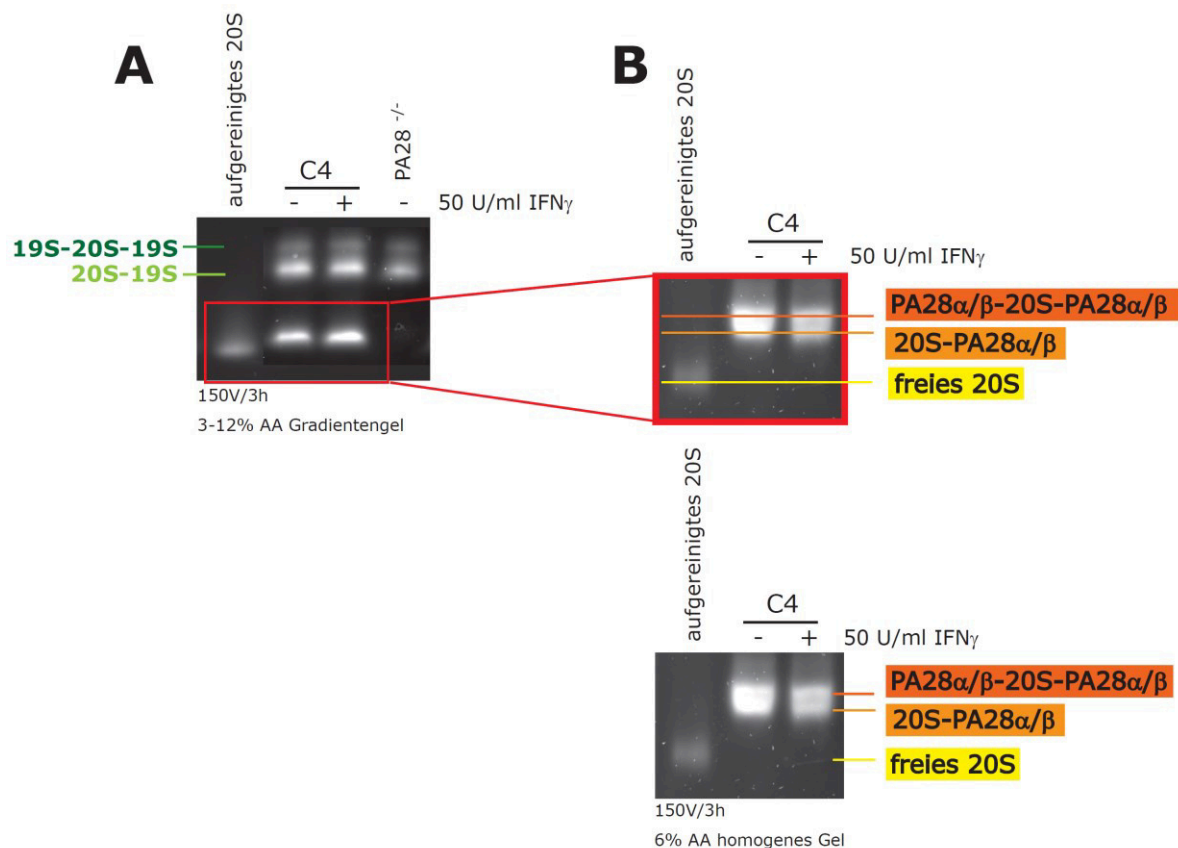
In den Fraktionen 16 bis 21 können die hochmolekularen Proteasomkomplexe detektiert werden, die zur leichteren Charakterisierung und zur Betonung der Unterschiede in zwei Gruppen unterteilt werden:

- Das 26S Proteasom (19S-20S) besitzt ein Molekulargewicht von ca. 1400 kDa. Die zusätzliche Assoziation eines PA28 $\alpha/\beta$  oder PA200 Aktivators erhöht die Masse auf etwa 1600 kDa und resultiert in den potentiellen Hybridkomplexen. Zusammenfassend werden diese Komplexe im Folgenden „26S/Hybrid“ genannt.
- Assoziiert ein 20S Proteasom mit zwei 19S Regulatorsubkomplexen, ergibt sich dem Sedimentationskoeffizienten entsprechend ein „30S Komplex“.

Die Fraktion 16 weist die höchste chymotryptische Aktivität auf und beinhaltet mehrheitlich den Proteasomsubtyp „26S/Hybrid“. Ab Fraktion 19 überwiegt der Anteil an 30S Proteasom, welches durch Instabilität in 26S und freies 19S zerfallen kann, was die Detektion von 26S/Hybrid in der nativen Gelelektrophorese aus den Aliquots der Fraktionen 20/21 erklären kann (vgl. Abb. 3-1B).

### **3.2. Das Aktivator assoziierte 20S Proteasom**

Die Assoziation eines Aktivators, wie dem PA28 $\alpha/\beta$ -Aktivator oder dem PA200-Aktivator, wird über die beiden äußeren, heptameren  $\alpha$ -Ringe des 20S Proteasoms vermittelt. Die Assoziation führt zu einem erhöhten Molekulargewicht und kann mittels fluorogenem Substratoverlay nach einer nativen Gelelektrophorese nachgewiesen werden. Neben den C4 Fibroblasten wurden auch murine embryonale Fibroblasten untersucht, die eine PA28 $\alpha/\beta$  Defizienz aufweisen (PA28<sup>-/-</sup> MEFs). Diese Zelllinie wurde als Kontrolle zu der PA28 $\alpha/\beta$ -Assoziation verwendet (vgl. Abb. 3-2).

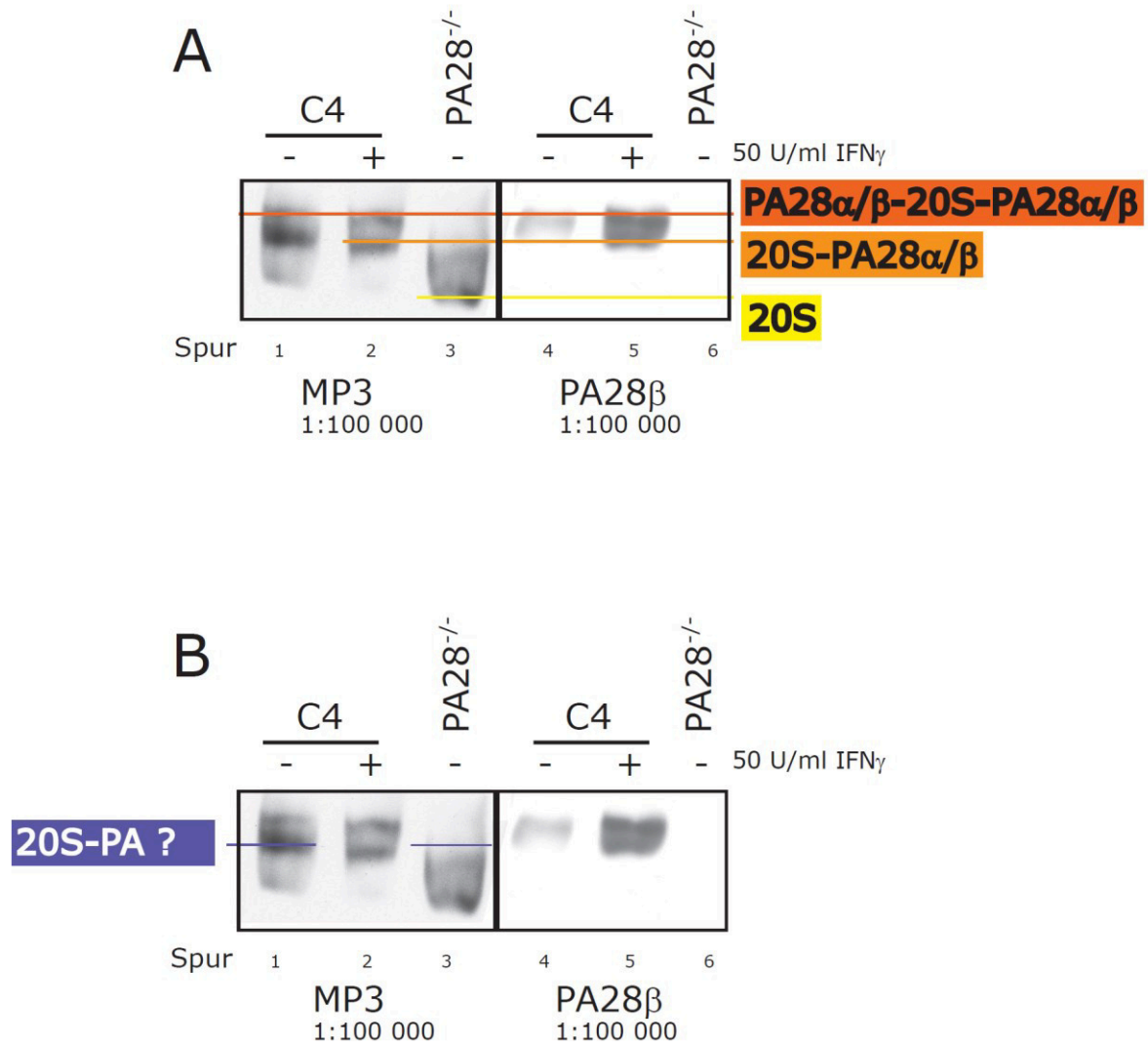


**Abb. 3-2 Die niedermolekulare Proteasompopulation zeigt ein- und beidseitig assoziierte 20S core Komplexe.** **A** native PAGE mittels Gradientengel (3-12% Acrylamid) des Zelllysates von murinen Fibroblasten C4 (unstimuliert und IFN $\gamma$  stimuliert) und murinen embryonalen Fibroblasten PA28 $^{-/-}$  mit anschließendem chymotryptischen Substratoverlay. **B** native PAGE (homogenes Gel mit 6% Acrylamid) des Zelllysates von murinen Fibroblasten C4 (unstimuliert und IFN $\gamma$  stimuliert) mit anschließendem chymotryptischen Substratoverlay. Das homogene native Gel (**B**) zeigt eine verbesserte Separation der niedermolekularen Proteasompopulation als das Gradientengel (**A**) (oben mit Hilfslinien, unten ohne Hilfslinien).

Die Auftrennung des Totallysates von C4 Zellen mittels nativer Gelelektrophorese zeigt eine Assoziation zwischen 20S Proteasom und Aktivatorkomplexen, bei dem es sich wahrscheinlich um den PA28 $\alpha/\beta$  Aktivator handelt. Der Unterschied zum Vergleich aufgetragenen, aufgereinigtem 20S Proteasom ist in Bezug auf das Molekulargewicht und den Substratumsatz deutlich zu erkennen, da dieses auf Grund der Aufreinigung mit keinem Aktivator assoziiert ist. Das homogene Nativgel zeigt, dass es sich um zwei Proteasomensubtypen handeln muss, was für eine ein- und beidseitige Assoziation von PA28 $\alpha/\beta$  sprechen kann (vgl. Abb. 3-2B).

Im Vergleich zu dem Lysat von C4 Fibroblasten kann im Totallysat von PA28 $^{-/-}$  MEFs kein aktives 20S Proteasom detektiert werden (vgl. Abb. 3-2A).

Für die Identifikation des assoziierten Aktivators, sowie die Darstellung der Abhängigkeit der Assoziation durch einen Stimulus wie dem Cytokin  $\text{IFN}\gamma$ , wurde das native Gel für den Immunoblot verwendet (vgl. Abb. 3-3).



**Abb. 3-3 Identifikation des assoziierten Aktivators an das 20S Proteasom aus verschiedenen Zelllinien. (Immunoblot der nativen PAGE aus Abb. 3-2). A** Immunoblot des in Abb. 3-2 aufgezeigten homogenen Nativgels. Detektion mit MP3 ( $\alpha$ 20S) (1:100 000) und PA28 $\beta$  (1:100 000). **B** zeigt die gleiche Abbildung wie **A**.

Der Western Blot der nativen PAGE zeigt, dass der proteasomale Aktivator PA28 $\alpha/\beta$  an einen oder beide  $\alpha$ -Ringe zugleich binden kann. C4 Zellen, die mit  $\text{IFN}\gamma$  stimuliert wurden, weisen sowohl mittels MP3-Antikörper, der das 20S Proteasom erkennt, als auch

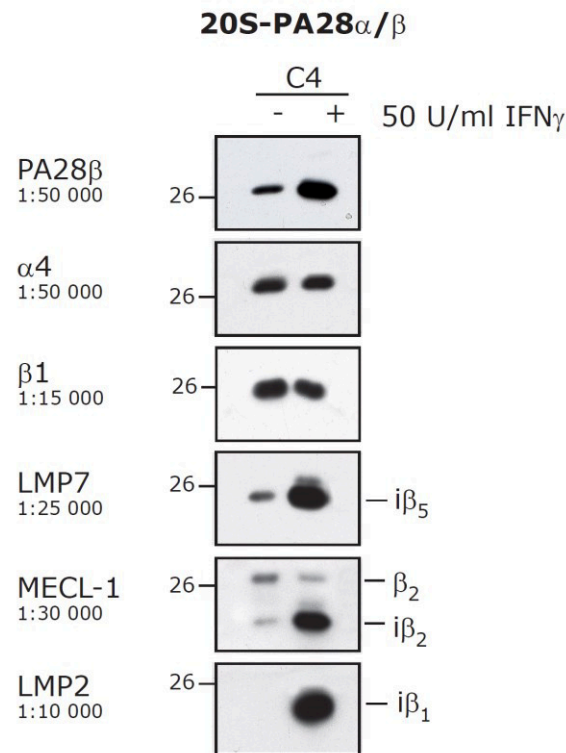
mittels PA28 $\beta$ -Antikörper eine Doppelbande auf, womit es sich um die Komplexe PA28 $\alpha/\beta$ -20S (orange) und PA28 $\alpha/\beta$ -20S-PA28 $\alpha/\beta$  (rot) handelt (Spur 2 und 5).

Der gegen das 20S Proteasom gerichtete Antikörper detektiert allerdings auch im Lysat der unstimulierten C4 und PA28<sup>-/-</sup> Zellen eine Doppelbande (Spur 1 und 3). Im Falle der PA28<sup>-/-</sup> Zellen muss es sich in Bezug auf das Molekulargewicht um den latenten 20S Komplex (gelb) und einen ebenfalls inaktiven, assoziierten 20S Komplex handeln (vgl. Abb. 3-2 und 3-3). Da diese Zellen kein PA28 $\alpha$  und PA28 $\beta$  exprimieren, könnte es sich in diesem Fall um eine Assoziation mit dem PA200 Aktivator handeln. Eine Assoziation mit PA200 könnte auch für nicht IFN $\gamma$  stimulierte C4 Fibroblasten zutreffen, da der PA28 $\beta$ -Antikörper hier nur eine Bande detektiert. Dieser potentielle 20S-PA200 Komplex ist allerdings chymotryptisch aktiv, da im Substratoverlay der nativen Gelelektrophorese zwei aktive Komplexe im Lysat der nicht IFN $\gamma$  stimulierten C4 Zellen detektiert wurden. Die möglicherweise auftretende Interaktion mit dem PA200 Aktivator wird in Kapitel 3.4. näher beschrieben.

### Inkorporation der Immununtereinheiten in niedermolekulare proteasomale Komplexe

Eine Stimulation mit dem Cytokin IFN $\gamma$  bewirkt die Expression der Immununtereinheiten LMP2 (i $\beta$ 1), MECL-1 (i $\beta$ 2) und LMP7 (i $\beta$ 5), die in neuassemblierte 20S *core* Komplexe eingebaut werden (Rock & Goldberg, 1999). Die horizontale native 2D PAGE belegt für die untersuchte Zelllinie C4 die Inkorporation der Immununtereinheiten in proteasomale Komplexe (vgl. Abb. 3-4) (vgl. Prinzip der nativen 2D PAGE in Kapitel 2.5.3.).

## horizontale native 2D PAGE



**Abb. 3-4 Inkorporation der Immununtereinheiten in die niedermolekulare Proteasompopulation.** Horizontale native 2D PAGE mit Totallysat von unstimulierten und IFN $\gamma$  stimulierten C4 Zellen.

Im Lysat der Fibroblastenzelllinie C4 kann nach 24stündiger IFN $\gamma$  Stimulation eine Inkorporation sämtlicher Immununtereinheiten LMP7, MECL-1 und LMP2 detektiert werden (vgl Abb. 3-4A und 3-4B). Die Immununtereinheiten LMP7 und MECL-1 lassen sich auch unter nicht IFN $\gamma$  stimulierten Bedingungen detektieren, wodurch ein kleiner Anteil der niedermolekularen Komplexe auch unter nicht stimulierten Bedingungen die Inkorporation von Immununtereinheiten aufweist.

Die Detektion von  $\beta$ 1 und  $\beta$ 2 in IFN $\gamma$  stimulierten C4 Zellen, sowie die Detektion von LMP7 und MECL-1 in unstimulierten C4 Zellen, weist auf die parallele Assemblierung des intermediären 20S Komplexes hin (m20S).

Da die Untereinheit PA28 $\beta$  stets mit der Untereinheit PA28 $\alpha$  zu heteroheptameren Ringen assembliert, ist die Detektion von PA28 $\beta$  in der nativen 2D Gelelektrophorese für

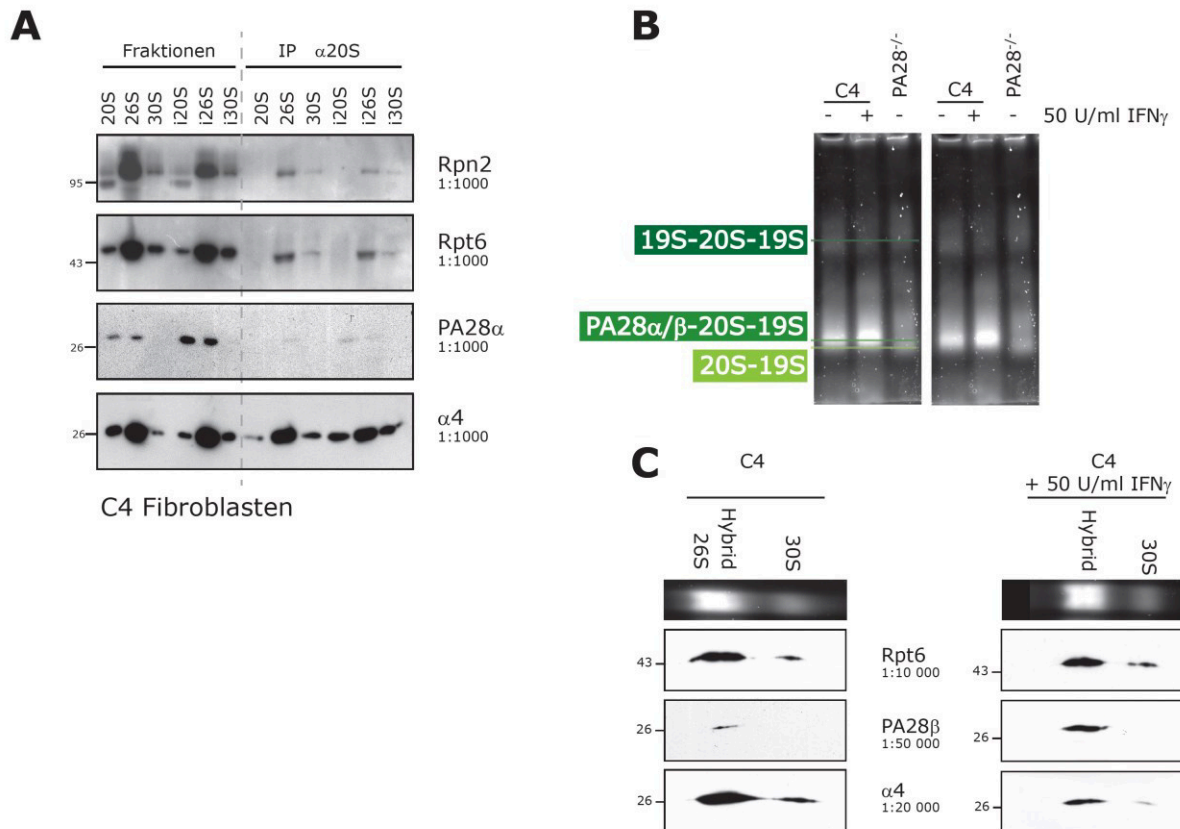


eine Aussage der PA28 $\alpha/\beta$  Assoziation ausreichend (Zhang et al., 1998; Rechsteiner et al., 2000).

### **3.3. Das 26S/Hybridproteasom und 30S Proteasom**

In Kapitel 3.2. wurde das „Aktivator assoziierte 20S Proteasom“ bezüglich der Identifikation des assoziierten Aktivators und der Inkorporation der Immununtereinheiten analysiert (vgl. Abb. 3-2 bis Abb. 3-4). Parallel erfolgte die Analyse der hochmolekularen Proteasomkomplexe 26S/Hybrid und 30S im Totallysat von C4 Fibroblasten und PA28<sup>-/-</sup> MEFs. Die Identifikation der Interaktionspartner erfolgte über eine native Gelelektrophorese (vgl. Abb. 3-5B), eine vertikale native 2D PAGE (vgl. Abb. 3-5C) und eine Co-Immunopräzipitation aus entsprechenden Fraktionen einer vorangegangenen Dichtegradientenzentrifugation (vgl. Abb. 3-5A). Der Antikörper war gegen mehrere Untereinheiten des proteasomalen 20S Komplexes gerichtet und ermöglichte die Präzipitation von proteasomal assoziierten Komplexen (vgl. Kapitel 2.5.6.).

Die Migration der proteasomalen Komplexe aus Zellextrakten ist bei der Elektrophorese eines kommerziellen Gradientengel (3-12% Acrylamid) auf einen kleinen Trennbereich limitiert (vgl. Abb. 3-2A). Die fünfstündige Elektrophorese der Extrakte im 4,5%igen, homogenen Gel erweitert den Trennbereich für die hochmolekularen Proteasomkomplexe deutlich (vgl. Abb. 3-5B). Das „Aktivator assoziierte 20S Proteasom“ kann in diesem Gel zwar nicht mehr detektiert werden, allerdings zeigen proteasomale Komplexe, welche mit dem 19S Regulator assoziiert sind, eine verbesserte Auftrennung zwischen „26S/Hybrid“ und „30S Proteasom“. Der 26S Komplex und das Hybridproteasom lassen sich allerdings auch in dieser Form des nativen Gels nur minimal separieren (Abb. 3-5C).



**Abb. 3-5 Auftrennung und Identifikation der hochmolekularen Proteasomkomplexe aus C4 Fibroblasten und PA28 $^{-/-}$  MEFs.** **A** Co-Immunopräzipitation aus Fraktionen nach der Gradientenzentrifugation mit Totallysat von unstimulierten und IFN $\gamma$  stimulierten C4 Fibroblasten **B** Native PAGE von Totallysat aus unstimulierten und IFN $\gamma$  stimulierten C4 Zellen und unstimulierten PA28 $^{-/-}$  MEFs. **C** vertikale native 2D PAGE mit Totallysat von unstimulierten und IFN $\gamma$  stimulierten C4 Fibroblasten.

Der chymotryptische Substratoverlay der nativen Elektrophorese des Totallysates von IFN $\gamma$  stimulierten C4 Fibroblasten zeigt eine gesteigerte Aktivität im Bereich des 26S/Hybridproteasoms (vgl. Abb. 3-5B). Hierbei handelt es sich um das PA28 $\alpha/\beta$ -Hybridproteasom, da neben PA28 $\beta$  auch Untereinheiten des 19S Regulators, Rpn2 und Rpt6, und die proteasomale Untereinheit  $\alpha$ 4 detektiert wurden (vgl. Abb. 3-5C und 3-5A). Vergleicht man die Bandenintensität von PA28 $\beta$  zwischen unstimulierten und IFN $\gamma$  stimulierten C4 Zellen lässt sich die induzierte Assoziation des PA28 $\alpha/\beta$  Komplexes erkennen. Eine PA28 $\alpha/\beta$  Assoziation wird demnach durch eine 24stündige IFN $\gamma$  Stimulation induziert.

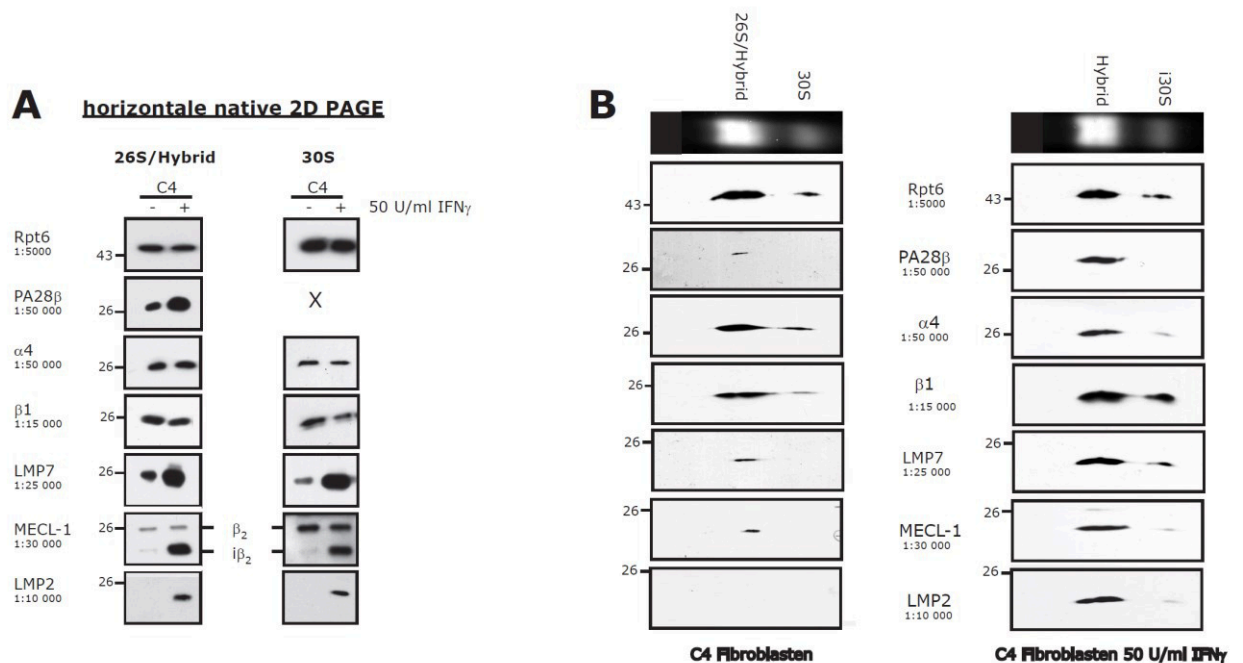
Der fluorogene Substratoverlay und die vertikale native 2D PAGE zeigen eindeutig, dass in C4 Fibroblasten mehr Hybridproteasom als 30S Proteasom assembliert wird (vgl. 3-5B

und 3-5C). In der Betrachtung des fluorogenen Substratoverlays, erkennt man, dass die IFN $\gamma$  Stimulation die divergente Assemblierung von Hybridproteasom und 30S Proteasom leicht verstärkt: die chymotryptische Aktivität des 30S Proteasoms ist in IFN $\gamma$  stimulierten, im Vergleich zu unstimulierten C4 Zellen, verringert. Vergleicht man zusätzlich die Bandenintensität des gegen  $\alpha 4$  gerichteten Antikörpers in der vertikalen nativen 2D PAGE von IFN $\gamma$  stimulierten und unstimulierten C4 Zellen, zeigt sich etwas weniger i30S als 30S Proteasom. Der chymotryptische Aktivitätsgraph zeigt ein Signalmaximum für den Bereich des 26S/Hybridproteasoms, was ebenfalls für eine erhöhte Assemblierung von 26S/Hybridproteasom sprechen kann (vgl. Abb. 3-1)

In PA28<sup>-/-</sup> Zellen ist der Unterschied in der Assemblierung von 26S/Hybrid und 30S Proteasom weniger deutlich, wobei dies in diesem Fall lediglich aus der proteasomalen Aktivität im Substratoverlays abgeleitet wird (vgl. 3-5B). Eine vertikale 2D PAGE kann dies allerdings bestätigen (Daten nicht gezeigt).

### Inkorporation der Immununtereinheiten in hochmolekulare proteasomale Komplexe

Die IFN $\gamma$  induzierbaren Immununtereinheiten werden in neusynthetisierte 20S *core* Komplexe inkorporiert (vgl. Abb. 3-4). Regulator-assoziiertes 26S, Hybrid oder 30S Proteasom muss dementsprechend ebenfalls neu assoziiert werden, sofern diese Komplexsubtypen den i20S *core* Komplex als katalytisches Zentrum tragen. Diese Fragestellung lässt sich mittels der horizontalen und vertikalen nativen 2D PAGE überprüfen (vgl. Abb. 3-6).



**Abb. 3-6 Inkorporation der Immunountereinheiten in 26S, Hybrid und 30S Proteasomsubtypen.** **A** horizontale native 2D PAGE mit Totallysat von unstimulierten und IFN $\gamma$  stimulierten C4 Zellen. **B** vertikale native 2D PAGE mit Totallysat von unstimulierten und IFN $\gamma$  stimulierten C4 Zellen.

Die Detektion sämtlicher Immununtereinheiten in der nativen 2D PAGE zeigt, dass neben dem PA28 $\alpha/\beta$  Aktivator auch der 19S Regulator an den i20S *core* Komplex binden kann (vgl. Abb. 3-6A/B und 3-4A/B). Der Austausch der katalytisch aktiven Untereinheiten hat somit offensichtlich keinen Einfluss auf die Assoziationsfähigkeit des Regulators an die proteasomalen  $\alpha$ -Untereinheiten.

Die Beobachtung aus Abbildung 3-5 zeigte, dass IFN $\gamma$  stimulierte C4 Zellen quantitativ mehr Hybridproteasom als 30S Komplexe aufweisen. Diese Tendenz lässt sich auch in Abbildung 3-6B mit der reduzierten Detektion von  $\alpha 4$  im Areal des 30S Proteasoms erkennen. Des Weiteren zeigt sich, dass das i30S Proteasom im Vergleich zum Hybridproteasom eher ein intermediäres 20S Proteasom als katalytischen Kernkomplex besitzt (vgl. Abb. 3-6A). Die Proteinbande der konstitutiven Untereinheit  $\beta 2$ , die ebenfalls durch den gegen MECL-1 gerichteten Antikörper detektiert wird, zeigt in der horizontalen nativen 2D PAGE von IFN $\gamma$  stimulierten C4 Fibroblasten nahezu die gleiche Intensität wie die Proteinbande der Immunountereinheit i $\beta 2$ . Im Hybridproteasom wird nach einer IFN $\gamma$  Stimulation überwiegend die Immunountereinheit i $\beta 2$  detektiert (vgl. Abb. 3-6A). In diesem Komplextyp wird somit offensichtlich mehrheitlich das i20S

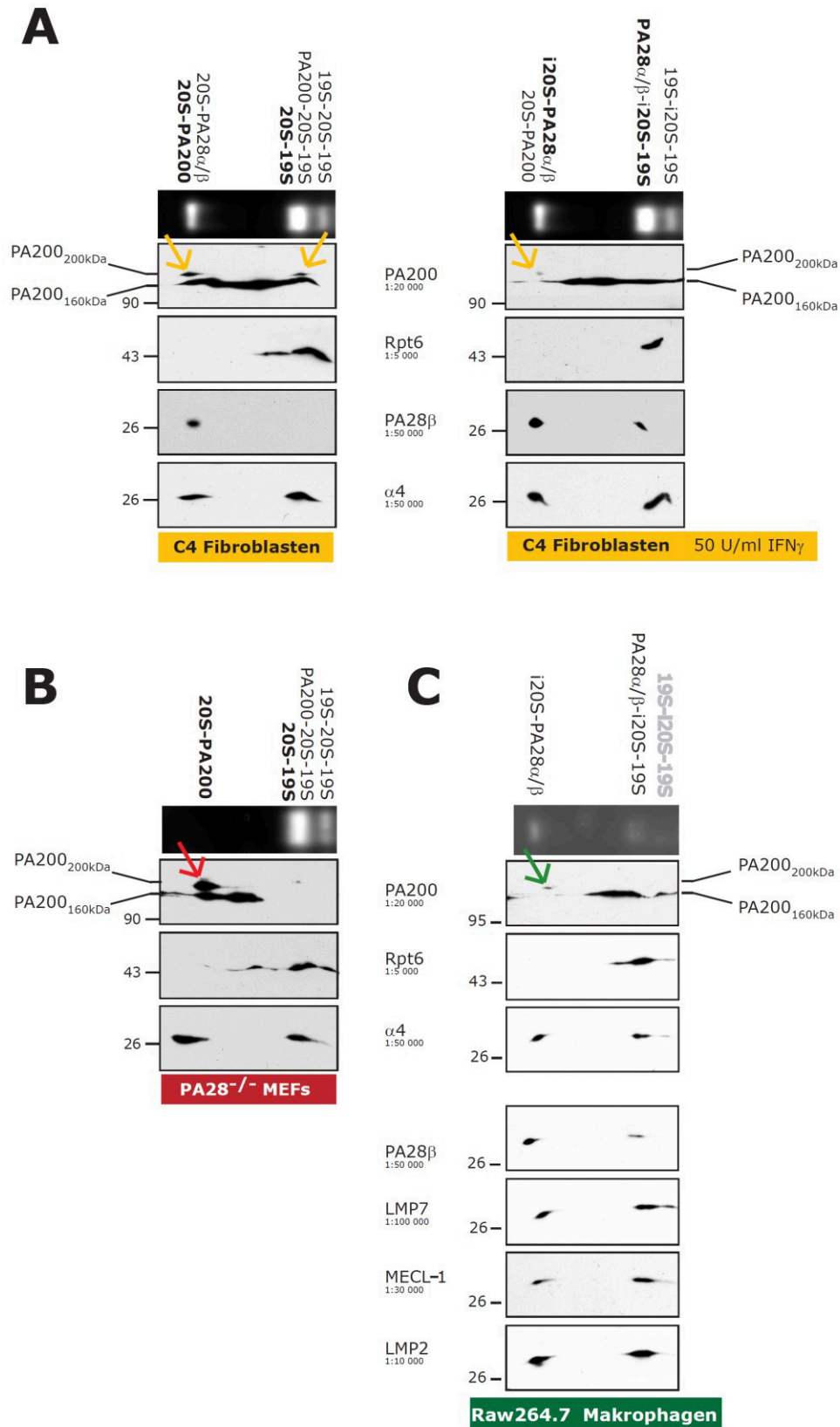
Proteasom mit dem 19S Regulator und dem PA28 $\alpha/\beta$  Aktivator assoziiert. Die Detektion von  $\beta 1$  weist in diesem Komplexsubtyp allerdings auch auf das intermediäre 20S Proteasom als katalytischen Kernkomplex hin, wobei die Rate der Inkorporation von Immununtereinheiten im Vergleich zum 30S Proteasom erhöht ist.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass unstimulierte C4 Fibroblasten 26S und 30S Komplexe ausbilden. Das PA28 $\alpha/\beta$ -Hybridproteasom kann nur sehr schwach detektiert werden. Nach einer 24stündigen IFN $\gamma$  Stimulation ist die intrazelluläre Assoziation zwischen PA28 $\alpha/\beta$ , i20S *core* Komplex und 19S Regulator induziert, sodass das Hybridproteasom quantitativ überwiegt. Das Cytokin IFN $\gamma$  induziert die Assemblierung des PA28 $\alpha/\beta$ -i20S/m20S-19S (Hybridproteasom) Komplexes und einen geringen Anteil von 19S-m20S/i20S-19S (i30S Proteasom).

### 3.4. Der proteasomale Aktivator PA200

In murinen Zellen und murinem Gewebe können zwei Isoformen des proteasomalen Aktivators PA200 detektiert werden: PA200<sub>160kDa</sub> und PA200<sub>200kDa</sub>. Beide lokalisieren im Nukleus, konnten allerdings auch im Cytoplasma detektiert werden. Die Funktion der Isoform PA200<sub>160kDa</sub> ist bislang unbekannt (Ustrell et al., 2002) (vgl. Kapitel 1.5.2).

Um eine mögliche Koloalisation zwischen proteasomalen Komplexen und den Isoformen des PA200 Monomers nachzuweisen, wurde Totallysat von unstimulierten und IFN $\gamma$  stimulierten C4 Fibroblasten sowie unstimulierten PA28<sup>-/-</sup> MEFs und Raw264.7 Makrophagen mittels vertikaler 2D nativer PAGE analysiert (vgl. Abb. 3-7).



**Abb. 3-7 Vergleich der beiden PA200-Isoformen in Bezug auf eine Komigration mit proteasomalen Komplexsubtypen in C4 Fibroblasten, PA28<sup>-/-</sup> MEFs und Raw264.7 Makrophagen. A** vertikale native 2D PAGE mit Totallysat von unstimulierten und stimulierten C4 Fibroblasten. **B** vertikale native 2D PAGE mit Totallysat von unstimulierten PA28<sup>-/-</sup> MEFs. **C** vertikale native 2D PAGE mit Totallysat von unstimulierten Raw264.7 Makrophagen.

In der Analyse des Extraktes von C4 Fibroblasten ist zu erkennen, dass die Isoform PA200<sub>160kDa</sub> über einen weiten Trennbereich detektiert werden kann (vgl. Abb. 3-7A links). Eine Kolokalisation zwischen 20S und PA200<sub>160kDa</sub> ist möglich. Auffällig ist jedoch, dass in Arealen, die eine Kodetection von  $\alpha 4$  zeigen, distinkte PA200<sub>200kDa</sub>-Banden detektiert werden. Bei Extrakten von unstimulierten C4 Fibroblasten betrifft das die Areale des „Aktivator assoziierten 20S *core* Komplexes“ und des „26S/Hybridproteasoms“. Nach einer 24stündigen IFN $\gamma$  Stimulation ist keine Kolokalisation zwischen PA200<sub>200kDa</sub> und  $\alpha 4$  sowie Rpt6 detektierbar (vgl. Abb. 3-7A rechts). Im Bereich des „Aktivator assoziierten 20S *core* Komplexes“ zeigt sich eine verminderte Intensität der PA200<sub>200kDa</sub>-Proteinbande. Die verminderte Detektion von PA200<sub>200kDa</sub> kann mit einer alternativen PA28 $\alpha/\beta$ -Assoziation erklärt werden, die durch eine Stimulation mit dem Cytokin IFN $\gamma$  induziert wird.

Zum Vergleich der C4 Fibroblasten wurde auch das Totallysat von unstimulierten PA28<sup>-/-</sup> MEFs und unstimulierten Raw264.7 Makrophagen analysiert. Da PA28<sup>-/-</sup> Zellen kein PA28 $\alpha$  und PA28 $\beta$  exprimieren, zeigt diese Zelllinie im Bereich des „Aktivator assoziierten 20S Proteasoms“ eine deutliche Assoziation mit PA200<sub>200kDa</sub>, wobei dieser Komplex eindeutig keine chymotryptische Aktivität zeigt (vgl. Abb. 3-7B). Die Makrophagen ähnliche Zelllinie Raw264.7 zeigt auch unter nichtstimulierten Bedingungen eine Expression und Inkorporation von Immununtereinheiten, sowie die Assoziation des PA28 $\alpha/\beta$  Aktivators. Eine Kolokalisation von PA200<sub>200kDa</sub> beschränkt sich auf den Bereich des „Aktivator assoziierten 20S *core* Komplexes“, allerdings ist die Intensität der detektierten Proteinbande sehr gering (vgl. Abb. 3-7C).

Der fluorogene Substratoverlay des Zellextraktes von PA28<sup>-/-</sup> MEFs zeigt eindeutig, dass PA200 trotz der Bezeichnung als proteasomaler „Aktivator“ keine Aktivitätssteigerung am 20S Proteasom induziert. Die Assoziation des PA200 Monomers bewirkt bei einer PA28 $\alpha/\beta$  Defizienz womöglich eine Inaktivierung des 20S Proteasoms.

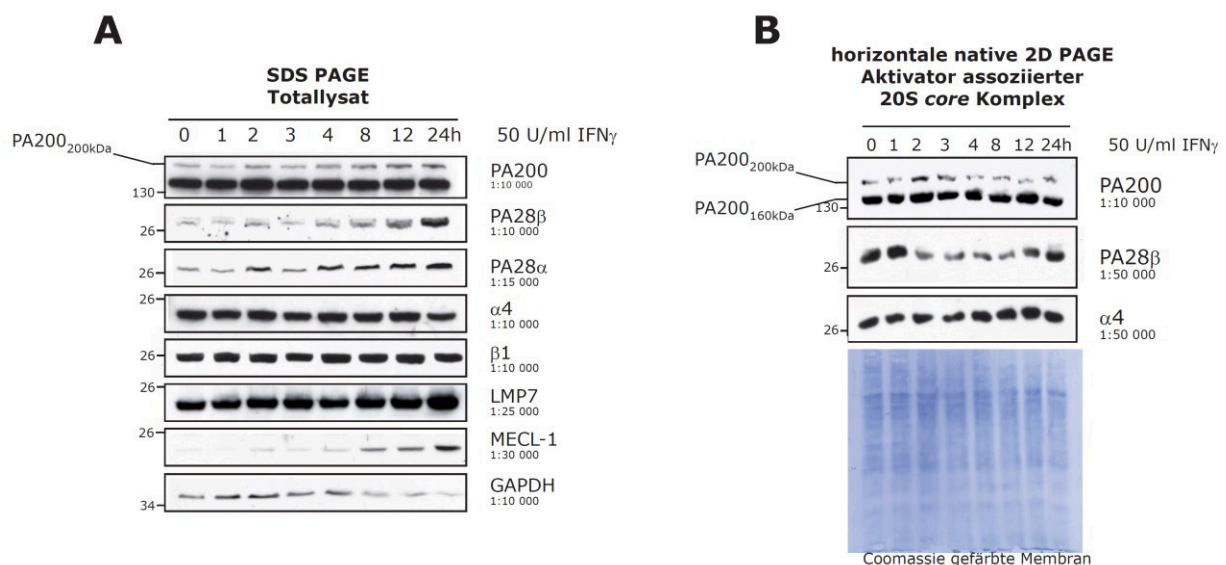
Die Expression der Isoform PA200<sub>160kDa</sub> ist auf murine Zellen und murines Gewebe limitiert, sodass geschlussfolgert werden kann, dass vermutlich keine spezifische Interaktion zwischen PA200<sub>160kDa</sub> und einem proteasomalen Komplex auftritt. PA200<sub>160kDa</sub>



könnte auch mit anderen Proteinen Interaktionen eingehen, die in Proteinkomplexen des detektierten Molekulargewichtsbereiches resultieren.

### Antagonistisches Assoziationsverhalten von PA200 und PA28 $\alpha/\beta$ Aktivatorkomplexen

In Abb. 3-7 (C4 Fibroblasten) ist zu erkennen, dass eine IFN $\gamma$  Stimulation die Dissoziation zwischen der Isoform PA200<sub>200kDa</sub> und dem 20S *core* Komplex initiiert (vgl. Abb. 3-7A). Die induzierte Expression und damit induzierte Assoziation von PA28 $\alpha/\beta$  könnte das PA200 Monomer vom 20S Proteasom verdrängen. Um zu testen, wann der Wechsel des Assoziationspartners am 20S *core* Komplex eintritt, wurden C4 Fibroblasten für kürzere Zeitpunkte mit dem Cytokin IFN $\gamma$  stimuliert und mittels horizontaler nativer 2D PAGE analysiert. Der Fokus wurde dabei auf das „Aktivator assoziierte 20S Proteasom“ gesetzt (vgl. Abb. 3-8B).



**Abb. 3-8 Antagonistische Assoziation von PA200 und PA28 $\alpha/\beta$  Aktivator an den 20S *core* Komplex.** **A** SDS PAGE des Totallysates von C4 Fibroblasten, die für die angegebenen Zeitpunkte mit IFN $\gamma$  stimuliert wurden. **B** horizontale native 2D PAGE des „Aktivator assoziierten 20S *core* Komplexes“. Vorangegangene native PAGE des Totallysates von C4 Fibroblasten, die für die angegebenen Zeitpunkte mit IFN $\gamma$  stimuliert wurden.

Analysiert man die Assoziation zwischen den zwei Aktivatoren und dem 20S *core* Komplex, erkennt man eine komplementäre Assoziation von PA28 $\alpha/\beta$  und PA200<sub>200kDa</sub>,



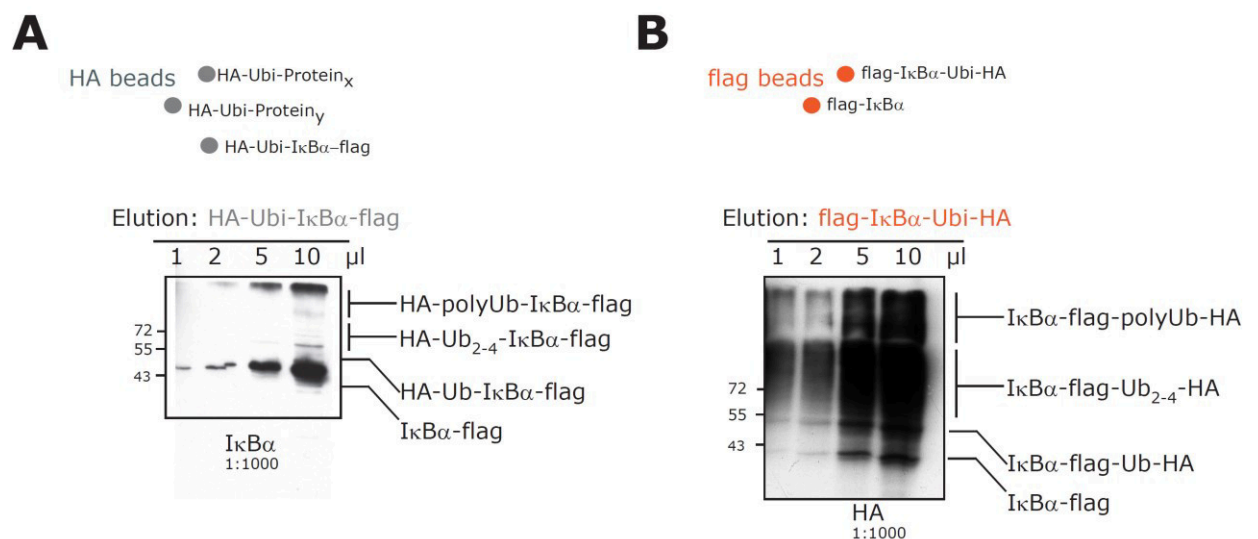
während die Detektion der proteasomalen Untereinheit  $\alpha 4$  unverändert bleibt (vgl. Abb. 3-8B):

- Unter unstimulierten Bedingungen kann im Totallysat sehr wenig PA28 $\alpha$  und PA28 $\beta$  detektiert werden (vgl. Totallysat Abb. 3-8A). Allerdings zeigt der „Aktivator assoziierte 20S *core* Komplex“ zum Zeitpunkt 0 eindeutig eine PA28 $\alpha/\beta$  Assoziation (vgl. native 2D PAGE Abb. 3-8B). Das 20S Proteasom liegt unter nichtstimulierten Bedingungen somit mehrheitlich als PA28 $\alpha/\beta$  assoziiertes 20S Proteasom vor.
- Zwei Stunden nach Beginn der IFN $\gamma$  Stimulation nimmt die Assoziation zwischen PA28 $\alpha/\beta$  und 20S *core* Komplex ab. Parallel lässt die ansteigende Detektion der PA200<sub>200kDa</sub>-Bande eine Zunahme der 20S-PA200 Assoziation vermuten (vgl. native 2D PAGE Abb. 3-8B). Da etwa zum gleichen Zeitpunkt, zwei Stunden nach Beginn der IFN $\gamma$  Stimulation, die Detektion von MECL-1 und LMP7 zunimmt, kann angenommen werden, dass mit der Expression der Immunnuntereinheiten die Assemblierung des Immunoproteasoms einsetzt (vgl. Totallysat Abb. 3-8A).
- Zwölf Stunden nach Beginn der IFN $\gamma$  Stimulation überwiegt die Assoziation zwischen dem 20S *core* Komplex und dem PA28 $\alpha/\beta$  Aktivator, die etwa 24 Stunden nach Beginn der IFN $\gamma$  Stimulation noch weiter gesteigert ist. Die Assoziation zu dem PA200 Komplex ist zeitlich vermindert (vgl. native 2D PAGE Abb. 3-8B).

Mit diesem Versuch konnte zum ersten Mal eine IFN $\gamma$ -abhängige Assoziation des PA200 Aktivators beschrieben werden, die sich auf einen Zeitraum von zwei bis drei Stunden nach Beginn der IFN $\gamma$  Stimulation beschränkt. Dabei könnte es sich um eine Assoziation mit neuassembliertem i20S Proteasom handeln.

### 3.5. Vergleich der Degradationseffizienz von verschiedenen proteasomalen Komplexsubtypen

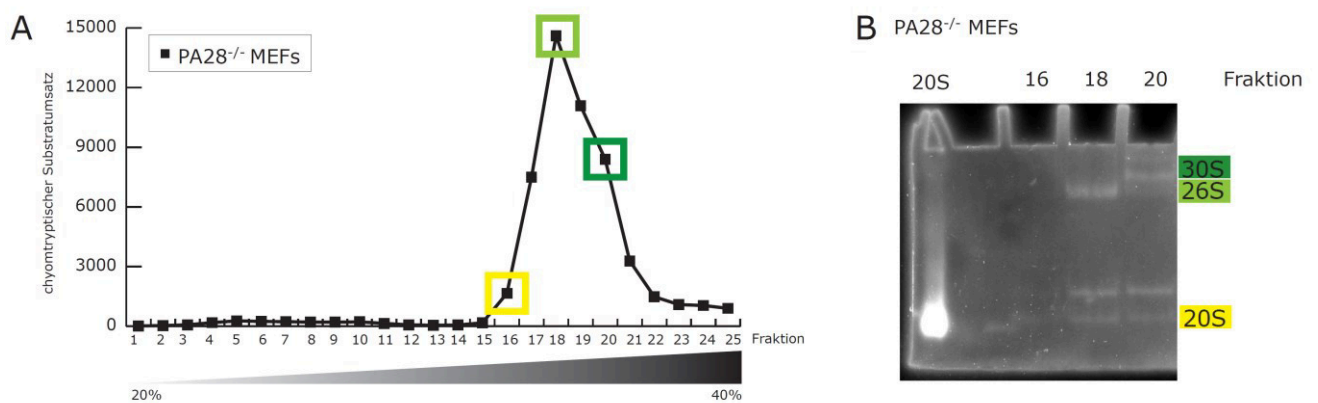
Die vorangegangenen Experimente zeigen, dass die Zelle eine heterogene Proteasompopulation assoziiert, deren individuelle Funktionen jedoch noch nicht ausreichend analysiert wurden. Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war deshalb, die spezifische Effizienz der Ubiquitin-abhängigen Degradation durch 26S, Hybrid und 30S Proteasom zu beschreiben. Zunächst wurde ein Substrat generiert, welches polyubiquitiniert vorliegt. Dazu wurden die Fusionsproteine HA-Ubiquitin und I $\kappa$ B $\alpha$ -flag in der murinen Fibroblastenzelllinie NIH3T3 parallel überexprimiert (vgl. Kapitel 2.2.). Auf Grund der hohen Expressionsrate beider Fusionsproteine kam es zu einer *in vitro* Ubiquitinierung von I $\kappa$ B $\alpha$ -flag mit HA-Ubiquitin. Diese intrazelluläre, kovalente Verknüpfung zwischen HA-Ubi und I $\kappa$ B $\alpha$ -flag führte zu dem ubiquitinierten Modellsubstrat HA-Ubi-I $\kappa$ B $\alpha$ -flag. Nach Lyse der transfizierten Zellen wurde das ubiquitinierte Fusionsproteins mittels HA-*beads* oder flag-*beads* isoliert. Im Immunoblot zeigt das generierte Modellsubstrat das typische Ubiquitinierungsmuster (vgl. Abb. 3-9).



**Abb. 3-9** *In vitro* generierte Modellsubstrate durch Purifikation mit HA-*beads* oder flag-*beads*. **A** Eluiertes HA-Ubi-I $\kappa$ B $\alpha$ -flag wurde in aufsteigender Konzentration mittels SDS PAGE aufgetrennt. **B** Eluiertes flag-I $\kappa$ B $\alpha$ -Ubi-HA wurde in aufsteigender Konzentration mittels SDS PAGE aufgetrennt.

Das Modellsubstrat ist von der Wahl der *beads* abhängig: mittels HA-*beads* wurde HA-Ubi-IkB $\alpha$ -flag eluiert (vgl. Abb. 3-9A) und mittels flag-*beads* wurde das Modellsubstrat flag-IkB $\alpha$ -Ubi-HA eluiert (vgl. Abb. 3-9B). Die Detektion von HA-Ubi-IkB $\alpha$ -flag erfolgt mit einem Antikörper gegen IkB $\alpha$ ; die Detektion von flag-IkB $\alpha$ -Ubi-HA erfolgt mit einem Antikörper gegen HA. Dies ermöglicht die Detektion von polyubiquitinierten Substraten (vgl. Kapitel 2.5.9) (vgl. Abb. 3-9A und B).

Beide Substrate können für die Messung der proteasomalen Degradation verwendet werden. Die Auftrennung in einzelne Proteasomsubtypen erfolgte über die Gradientenzentrifugation. Eine Trennung in 20S, 26S und 30S Proteasom ist über diese Methode möglich (Kopp et al., 2001). Dies bestätigt auch die native Gelelektrophorese der einzelnen Gradientenfractionen aus dem Lysat von PA28<sup>-/-</sup> MEFs (vgl. Abb. 3-10A und B).



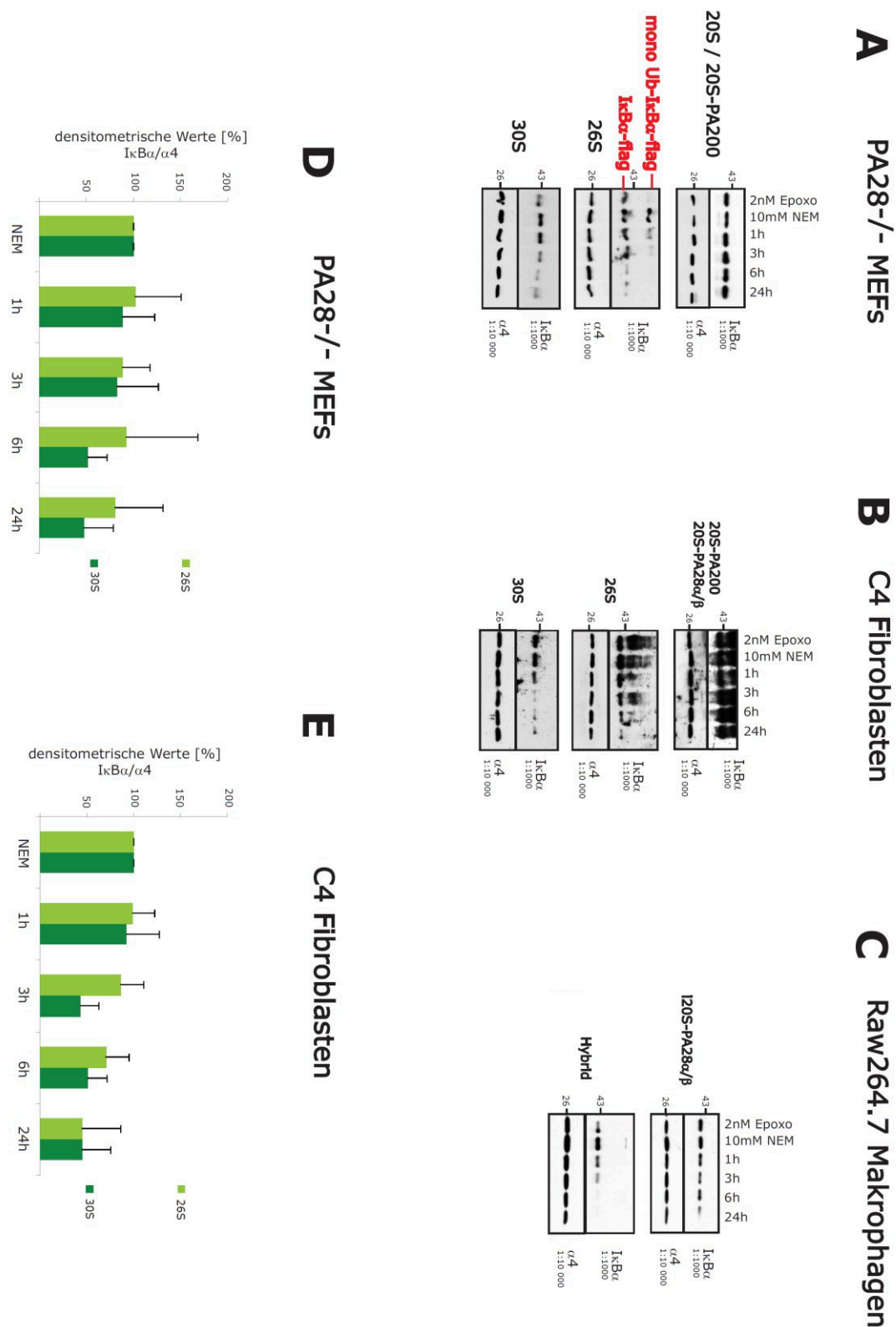
**Abb. 3-10 Die Selektion spezifischer Gradientenfractionen ermöglicht die Messung der Degradationseffizienz einzelner Proteasomsubtypen.** **A** chymotryptischer Aktivitätsgraph nach der Gradientenzentrifugation mit Totallysat von PA28<sup>-/-</sup> MEFs. **B** chymotryptischer Substratoverlay der nativen PAGE von ausgewählten Fractionen bestätigt die Separation in einzelne Komplexsubtypen.

Um unterschiedliche proteasomale Komplexe zu vergleichen, wurden drei verschiedene Zelllinien verwendet: C4 Fibroblasten, PA28<sup>-/-</sup> MEFs und die Makrophagenzelllinie Raw264.7. Die Kapitel 3.1. bis 3.4 zeigen die Struktur der zellspezifischen Proteasomsubkomplexe. Mittels der Separation durch die Gradientenzentrifugation können somit folgende proteasomale Subtypen miteinander verglichen werden:

- **20S / 20S-PA200** (aus PA28<sup>-/-</sup> MEFs)
- **20S-PA28 $\alpha$ / $\beta$  und i20S-PA28 $\alpha$ / $\beta$**  (aus C4 Fibroblasten, Raw264.7 Makrophagen)
- **26S** (aus PA28<sup>-/-</sup> MEFs, C4 Fibroblasten)
- **Hybrid (PA28 $\alpha$ / $\beta$ -i20S-19S)** (aus Raw264.7 Makrophagen und IFN $\gamma$  stimulierten C4 Fibroblasten)
- **30S** (aus PA28<sup>-/-</sup> MEFs)
- **i30S** (IFN $\gamma$  stimulierten C4 Fibroblasten).

(siehe detaillierte Charakterisierung Kapitel 3.2. und 3.3.)

Nach der Gradientenzentrifugation werden mittels chymotryptischer Aktivitätsmessung die einzelnen Fraktionen ausgewählt, die die spezifischen proteasomalen Subtypen beinhalten. Um die Ubiquitin-vermittelte Degradation zu starten, wurden 10 $\mu$ l von jeder ausgewählten Fraktion mit 2 $\mu$ l des eluierten Substrates bei 37°C inkubiert. Das Gesamtvolumen betrug 50 $\mu$ l. Die Inkubation wurde zu verschiedenen Zeitpunkten durch die Zugabe von 10x SDS-Probenpuffer und sofortigem Kochen bei 95°C abgestoppt. Als Kontrollwerte wurden der proteasomale Inhibitor Epoxomicin, sowie der Inhibitor NEM, welcher die deubiquitinierende Funktion reduziert, verwendet. Für die Inhibition wurde das Aliquot der ausgewählten Fraktion mit dem Inhibitor versetzt und für 30 Minuten bei 37°C vorinkubiert. Anschließend erfolgte die dreistündige Inkubation mit dem Modellsubstrat. Nach abgeschlossener Inkubation lässt sich die Degradation im Immunoblot darstellen (vgl. Abb. 3-11).



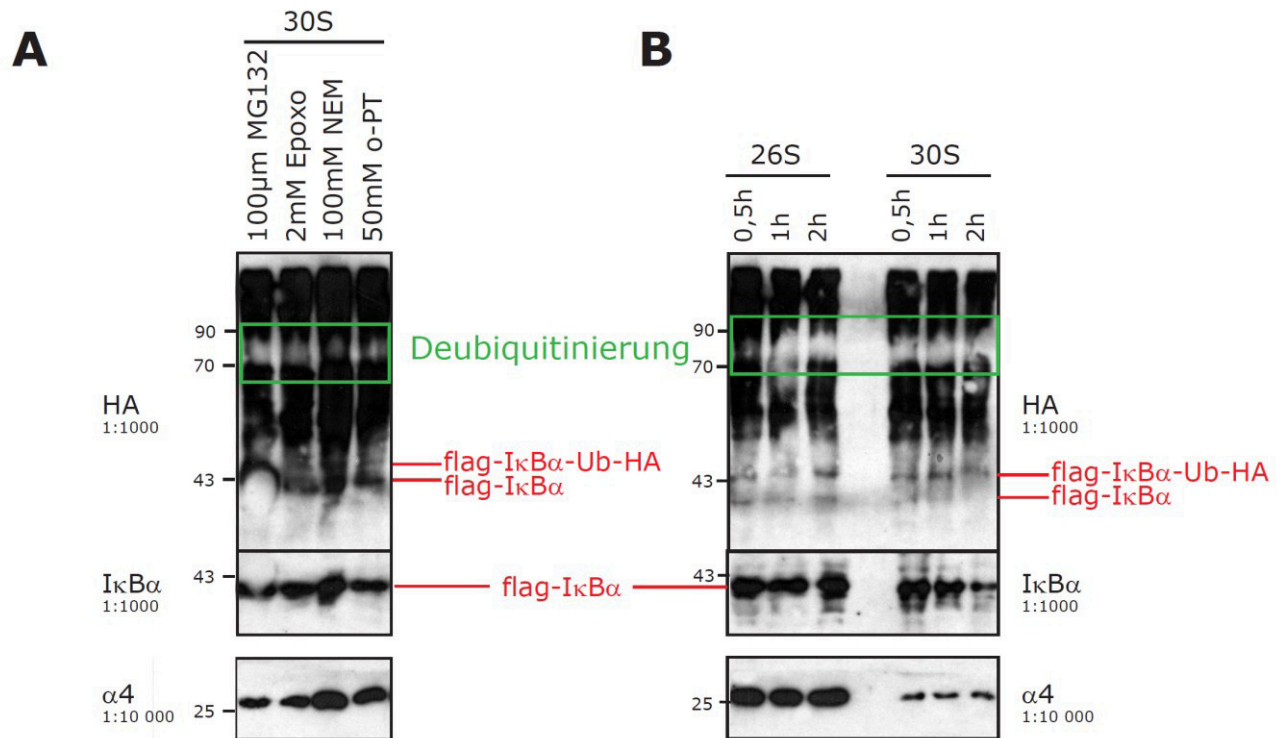
**Abb. 3-11** Proteasomale Degradationseffizienz des Modellsstrates HA-Ubi-IκBα-flag durch unterschiedliche proteasomale Komplexsubtypen. Die Gradientenzentrifugation aus Totallysaten von den Zelllinien PA28<sup>-/-</sup> MEFs (**A**), C4 Fibroblasten (**B**) und Raw264.7 Makrophagen (**C**) ermöglichte die Gewinnung verschiedener Proteasomsubtypen, die im Degradationsassay eingesetzt wurden. **D** und **E** Die densitometrische Auswertung stellt die Korrelation IκBα/α4 dar, wobei die Kontrolle „NEM“ als Ausgangswert dient. Mittelwerte entstammen aus fünf (**D**) bzw. vier (**E**) unabhängigen Experimenten für das Substrat HA-Ubi-IκBα-flag.

Das PA28 $\alpha/\beta$  assoziierte 20S (vgl. Abb. 3-11B), das PA200 assoziierte 20S (vgl. Abb. 3-11A) oder auch das PA28 $\alpha/\beta$  assoziierte i20S Proteasom (vgl. Abb. 3-11C) können das polyubiquitinierte I $\kappa$ B $\alpha$ -flag nicht abbauen. Auch nach 24stündiger Inkubationszeit lässt sich I $\kappa$ B $\alpha$ -flag in fast unveränderter Signalstärke detektieren. Die Substratdegradation ist dagegen bei einer Inkubation mit 26S Proteasom, dem Hybridproteasom sowie dem 30S Proteasom messbar. Das 30S Proteasom weist im Falle der PA28 $^{-/-}$  Zellen sowie der C4 Fibroblasten die größere Effizienz auf, da bereits nach 3h Inkubation eine deutliche Reduktion des Signals erkennbar ist (vgl. Abb. 3-11 A/B und 3-11D/E). Das 26S Proteasom zeigt eine Degradationseffizienz, die erst nach etwa sechs Stunden detektierbar ist.

Raw264.7 Makrophagen ähnliche Zellen assemblieren vorwiegend i20S-PA28 $\alpha/\beta$  und PA28 $\alpha/\beta$ -i20S-19S (vgl. Abb. 3-7). Das extrahierte Hybridproteasom zeigt eine hohe Degradationseffizienz, da nach der dreistündigen Inkubation eine deutliche Signalreduktion von I $\kappa$ B $\alpha$ -flag detektiert wird.

Da die mit NEM behandelte Probe bei einer Detektion mit dem gegen I $\kappa$ B $\alpha$  gerichteten Antikörper die Proteinbande mit der größten Densitometrie aufwies, wurden die einzelnen I $\kappa$ B $\alpha$ /4 Werte in der densitometrischen Auswertung zu NEM, und nicht zu Epoxomicin, korreliert (vgl. Abb. 3-11D und E). NEM hemmt die Deubiquitinierung der transient assoziierten DUBs und destabilisiert das 26S/30S Proteasom. Diese Destabilisation führte zu einer Anreicherung von I $\kappa$ B $\alpha$ , die im Western Blot detektiert wurde.

Die Degradation lässt sich durch proteasomale Inhibitoren unterbinden, welche die Aktivität der  $\beta$ -Untereinheiten oder die Funktion der deubiquitinierenden Proteine (DUBs) wie Rpn11 und Usp14/Ubp6 reduzieren (vgl. Abb. 3-12).



**Abb. 3-12 Einfluss verschiedener proteasomaler Inhibitoren auf die Degradations- und Deubiquitinierungseffizienz des Modells substrates flag-IκBα-Ubi-HA durch 26S und 30S Proteasom aus PA28<sup>-/-</sup> MEFs.** **A** Das 30S Proteasom, aus der Gradientenzentrifugation gewonnen, wurde für 30min mit den angegebenen Inhibitoren inkubiert. Anschließend Inkubation (3h) mit dem Modells substrat flag-IκBα-Ubi-HA. **B** Das ebenfalls aus der Gradientenzentrifugation gewonnene 26S Proteasom wurde wie das 30S Proteasom mit dem Modells substrat flag-IκBα-Ubi-HA für die angegebenen Zeitpunkte inkubiert (grün: Bereich der Deubiquitinierung).

Die Inhibitoren der DUB's, o-Phenanthrolin (o-PT) und NEM, können die Deubiquitinierung des Substrates flag-IκBα-Ubi<sub>poly</sub>-HA hemmen (vgl. Abb. 3-12). Der in der Abbildung grünmarkierte Bereich stellt das polyubiquitinierte Substrat flag-IκBα-Ubi<sub>poly</sub>-HA dar, welches nach der Alkylierung eines Cysteins im aktiven Zentrum der DUBs durch 10mM NEM vermindert deubiquitiniert wird (vgl. Abb. 3-12 A NEM). O-Phenanthrolin ist ein weiterer Metalloprotease-Inhibitor, allerdings bewirkt er im Vergleich zu NEM keine 26S/30S Destabilisation. Die Verwendung dieses Inhibitors bewirkt eine Inhibition des Zinkatoms im aktiven Zentrum von Rpn11. Beide Inhibitoren zeigen eine ähnliche Wirksamkeit (vgl. Abb. 3-12A). Die anderen Experimente wurden mit NEM durchgeführt.



Die Deubiquitinierung ist vermutlich nicht komplett inhibiert, aber die verminderte Deubiquitinierungsrate wird durch die Abnahme der Signalstärke im Molekulargewichtsbereich zwischen 70 – 90 kDa deutlich (grün markiert, HA (1:1000) Detektion). Vergleicht man diesen Molekulargewichtsbereich aus Abb. 3-11A und 3-11B, lässt sich erkennen, dass die Inhibitoren NEM und o-Phenanthrolin die Deubiquitinierung reduzieren können, wohingegen nicht inhibiertes 26S und 30S Proteasom eine deubiquitinierende Aktivität bzw. einen Abbau von mehrfach ubiquitiniertem flag-IkBa-Ubi<sub>poly</sub>-HA aufweisen.

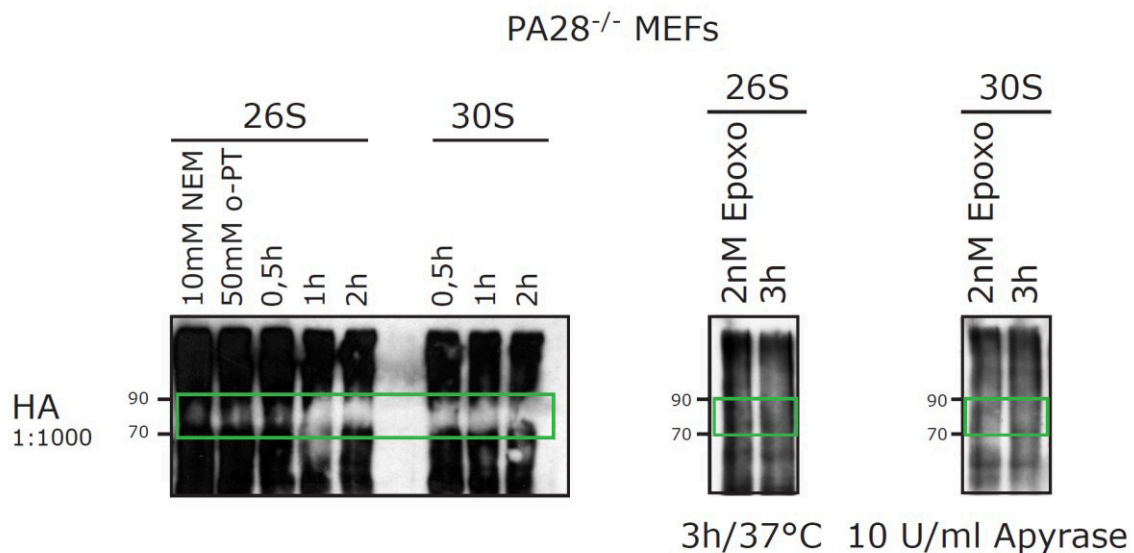
Eine Inhibition mit MG132 und Epoxomicin nimmt kaum Einfluss auf die Deubiquitinierung, wie im Vergleich zu den Inhibitoren NEM und o-Phenanthrolin zu erkennen ist. Diese proteasomalen Inhibitoren können kovalent reversibel bzw. kovalent irreversibel an das aktive Zentrum der  $\beta$ -Untereinheiten binden. Dabei erfolgt eine sehr effektive Inhibition der chymotryptischen Aktivität, die in Abb. 3-12 deutlich wird (Beck, Dubiella & Groll, 2012). Beide proteasomalen Inhibitoren bewirken eine deutlich geminderte Degradationseffizienz, da die Signalstärke von IkBa auch über die zweistündige Inkubationszeit konstant bleibt. In der gleichen Zeitspanne kann man die Reduktion von IkBa-flag, detektiert durch die Antikörper HA und IkBa, bei einer Inkubation mit 30S beobachten (vgl. Abb. 3-12A).

Bezüglich der Degradationseffizienz lässt sich schlussfolgern, dass das 30S Proteasom auch das Substrat flag-IkBa-Ubi-HA effizienter abbauen kann (vgl. Abb. 3-11 und Abb. 3-12). Die hier detektierte Signalabnahme steht einem stabilen Signal von IkBa-flag bei einer maximal zweistündigen Inkubation mit dem 26S Proteasom gegenüber (ebenfalls durch IkBa- und HA-Antikörper detektierbar) (vgl. Abb. 3-12B). Des Weiteren scheint das 30S Proteasom die größere Deubiquitinierungseffizienz zu besitzen, da die Signalstärke im Bereich zwischen 70 – 90 kDa eindeutig schwächer wird. Soweit lässt sich sagen, dass das 30S Proteasom, im Vergleich zum 26S Proteasom, eine bessere Deubiquitinierungs- sowie Degradationseffizienz zeigt.

Die deubiquitinierende Funktion eines proteasomalen Komplexes kann durch die Destabilisation des assoziierten 19S Regulators gemindert werden. Um die Deubiquitinierungseffizienz der hochmolekularen Proteasomsubtypen zu testen, wurden



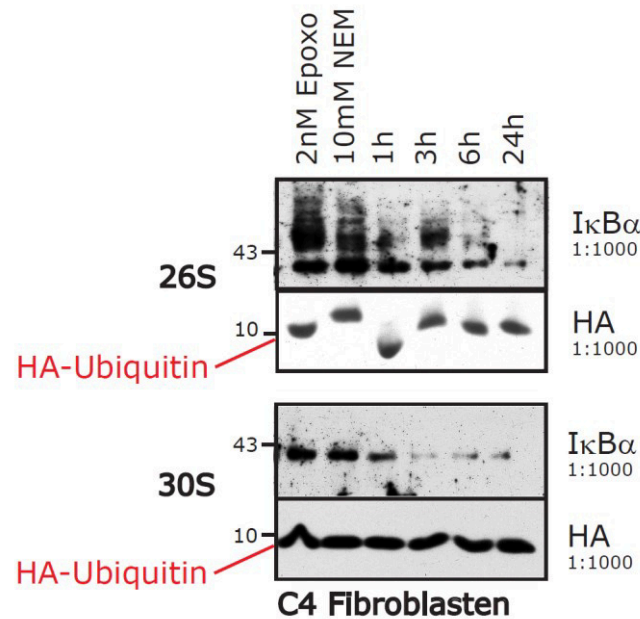
die ausgewählten Fraktionen mit 10 U/ml Apyrase inkubiert. Das Enzym Apyrase hydrolysiert ATP, welches zur Stabilität des ATPase-Rings des 19S Regulators benötigt wird. Die Hydrolyse von ATP führt somit zu einer Destabilisation der Interaktion zwischen ATPase-Ring und  $\alpha$ -Untereinheiten. Dieser Effekt wurde auch im Degradationsassay untersucht (vgl. Abb. 3-13).



**Abb. 3-13 Inhibitorischer Effekt von Apyrase auf die Deubiquitinierung von flag-I $\kappa$ B $\alpha$ -Ubi-HA durch 26S und 30S aus PA28<sup>-/-</sup> MEFs.** Die ausgewählten Fraktionen, das 26S und 30S Proteasom beinhaltend, wurden jeweils für 3h mit 10U/ml Apyrase inkubiert. Anschließend wurden die proteasomalen Subtypen für 30min mit 2nM Epoxomicin vorinkubiert oder sofort mit dem Modellsupstrat flag-I $\kappa$ B $\alpha$ -Ubi-HA inkubiert. (grün: Bereich der Deubiquitinierung)

Nach einer dreistündigen Apyraseinkubation und einer zusätzlichen dreistündigen Inkubation mit dem Substrat flag-I $\kappa$ B $\alpha$ -Ubi-HA, lässt sich keine Deubiquitinierung erkennen (vgl. Abb. 3-13 rechts). Fraktionen, die nicht mit Apyrase inkubiert wurden, zeigen eine Reduktion des Signals zwischen 70 - 90 kDa, was einer Deubiquitinierung entspricht (Abb. 3-13 links, grün umrandet, aus Abb. 3-12B). Apyrase bewirkt durch die gesteigerte ATP-Hydrolyse eine Destabilisation des 19S Regulators, der die Deubiquitinierung vermittelt.

Während des Proteinabbaus erfolgt die parallele Deubiquitinierung des Substrates, welche einzelnes Ubiquitin freisetzt. Eine Zunahme der Bandenintensität von freiem HA-Ubiquitin im Zeitverlauf der Inkubation würde Aufschluss über die Freisetzung von HA-Ubiquitin geben (vgl. Abb. 3-14).

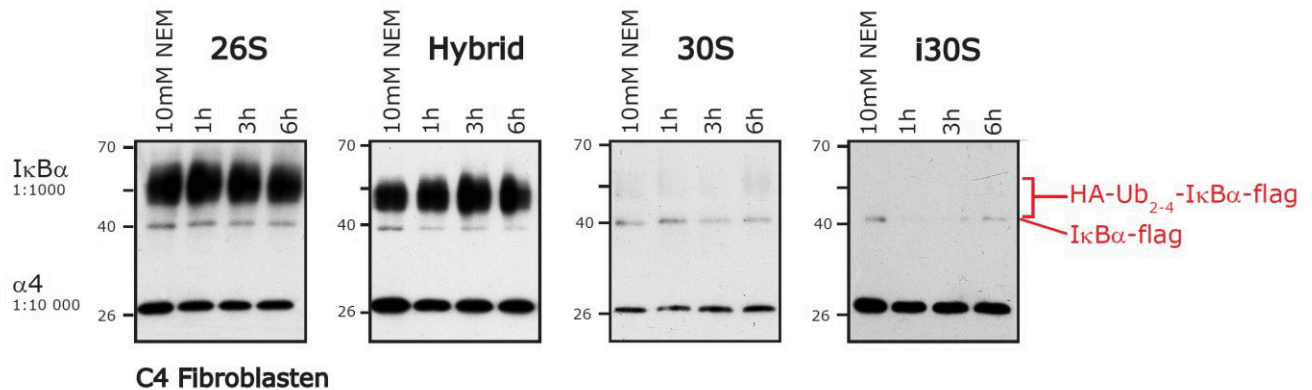


**Abb. 3-14 Die Deubiquitinierung von HA-Ubi-IκBα-flag durch das 26S und 30S Proteasom setzt kein HA-Ubiquitin frei.** Die ausgewählten Fraktionen, das 26S und 30S Proteasom beinhaltend, wurden jeweils mit dem Modellsubstrat HA-Ubi-IκBα-flag inkubiert.

Wird das Substrat HA-Ubi-IκBα-flag mit 26S oder 30S Proteasom inkubiert, ist im zeitlichen Verlauf keine Zunahme von freiem Ubiquitin zu erkennen (vgl. Abb. 3-14). Dies spricht für eine komplette Degradation des Substrates HA-Ubi-IκBα-flag inklusive von HA-Ubiquitin. In der intrazellulären Proteindegradation wird Ubiquitin über DUBs vom abzubauenen Protein abgespalten und nicht degradiert. Dieser Prozess könnte durch die Verknüpfung von Ubiquitin mit HA blockiert sein, zumal die Aminosäuresequenz der HA-Domäne keine Faltung aufweist und entfaltete Domänen zusammen mit der Ubiquitinkette als Abbausignal fungieren (Liu & Jacobsen, 2012). Des Weiteren handelt es sich hier um eine *in vitro* Degradation, welche nicht direkt mit intrazellulären Vorgängen verglichen werden kann.

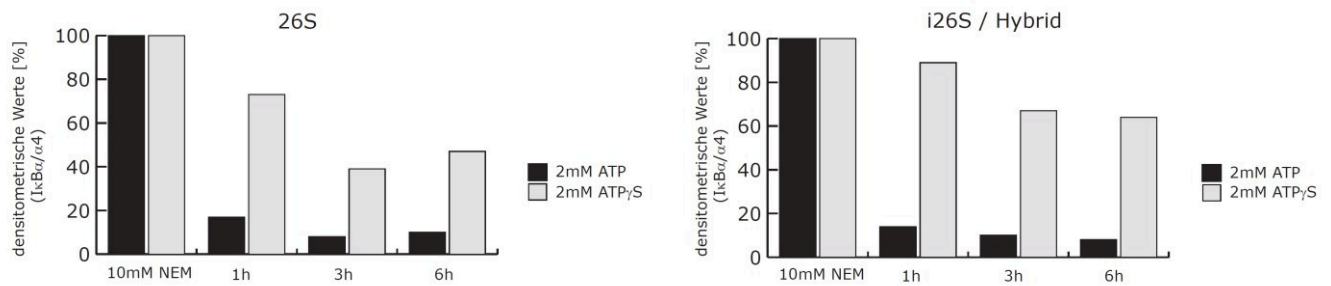
Schlussfolgernd lässt sich sagen, dass das 30S Proteasom die Substrate HA-Ubi-IκBα-flag und flag-IκBα-Ubi-HA effizienter deubiquitiniert und degradieren kann als das 26S Proteasom (Deubiquitinierung vgl. Abb. 3-12B und Degradation vgl. Abb. 3-11A und B/3-12B). Dies trifft für die Zelllinien C4 und PA28<sup>-/-</sup> zu. Der Makrophagen-ähnliche Zelltyp Raw264.7 weist dahingegen sehr effizientes Hybridproteasom auf (vgl. Abb. 3-11C). Die Effizienz des Hybridproteasoms kann durch den i20S *core* Komplex, welches das Zentrum

des proteasomalen Komplexes darstellt, begründet sein. Um dies zu testen, wurden C4 Fibroblasten mit IFN $\gamma$  stimuliert, um die Assoziation von i26S/Hybrid und i30S Proteasom zu induzieren (vgl. Abb. 3-6). Diese proteasomalen Komplexe wurden nach dem Aufreinigungsschritt der Gradientenzentrifugation mit 26S und 30S Proteasom aus unstimulierten C4 Fibroblasten verglichen (vgl. Abb. 3-15).



**Abb. 3-15 Degradation von HA-Ubi-IκBα-flag durch konstitutives 26S / 30S und Hybrid / i30S Proteasom.** 26S und 30S Proteasom wurden aus dem Totallysat von unstimulierten C4 Fibroblasten gewonnen; Hybrid und i30S Proteasom wurden aus dem Totallysat von IFN $\gamma$  stimulierten C4 Fibroblasten gewonnen. Die Inkubation erfolgte wie zuvor beschrieben (vgl. Abb. 3-11).

Vergleicht man die Degradationseffizienz des Hybridproteasoms mit der Effizienz des 26S Proteasoms, lässt sich eine deutlich gesteigerte Abbaurate von HA-Ubi-IκBα-flag detektieren (vgl. Abb. 3-15). Das 30S Proteasom weist eine, im Vergleich zum 26S Proteasom, gesteigerte Degradation von IκBα-flag auf. Eine Inkubation mit dem i30S Proteasom zeigt eine zusätzlich gesteigerte Degradationseffizienz. Der i20S *core* Komplex vermag durch die Inkorporation von Immununtereinheiten polyubiquitinierte Substrate effizienter zu degradieren, sofern es an den 19S Regulator gebunden ist (vgl. Abb. 3-11C). Die Depletion von ATP, durch die Inkubation mit 10 U/ml Apyrase induziert, inhibiert die Deubiquitinierung des Substrates flag-IκBα-Ubi-HA (vgl. Abb. 3-13). Die Proteindegradation zeigt eine Abhängigkeit zu ATP, da es für die Funktion der ATPasen des 19S Regulators essentiell ist. Neben dem Binden von ATP, ist auch die ATP-Hydrolyse ein wichtiger Schritt im Proteinabbau. Das Nukleotid ATP $\gamma$ S ist eine nicht-hydrolysierbare Variante des Nukleotids ATP, und kann die Notwendigkeit der ATP-Hydrolyse veranschaulichen (vgl. Abb. 3-16).



**Abb. 3-16 Inhibitorischer Effekt von ATPγS auf die Degradation von HA-Ubi-IκBα-flag durch 26S und Hybrid** Das 26S wurde aus dem Totallysat von unstimulierten C4 Fibroblasten gewonnen; das Hybrid wurde aus dem Totallysat von IFNγ stimulierten C4 Fibroblasten gewonnen. Die Inkubation erfolgte wie zuvor beschrieben. Die Detektion erfolgte mittels Immunoblot gegen α4 (1:10 000) und IκBα (1:1000). Anschließend erfolgte eine densitometrische Auswertung der Signalstärke von α4 (Kontrolle) und IκBα (Relation: IκBα/α4).

Der Substratpuffer des Reaktionsansatzes der vorangegangenen Experimente enthielt 2mM ATP. Wurde der Substratpuffer mit 2mM ATPγS versetzt, ist die Degradationseffizienz von 26S sowie von i26S/Hybrid deutlich vermindert. Die Suppression der Degradation zeigt bei der Inkubation mit i26S/Hybrid einen dramatischeren Effekt, da es im Vergleich zum 26S Proteasom ein effektiveres Degradationspotential aufweist (vgl. Abb. 3-16).

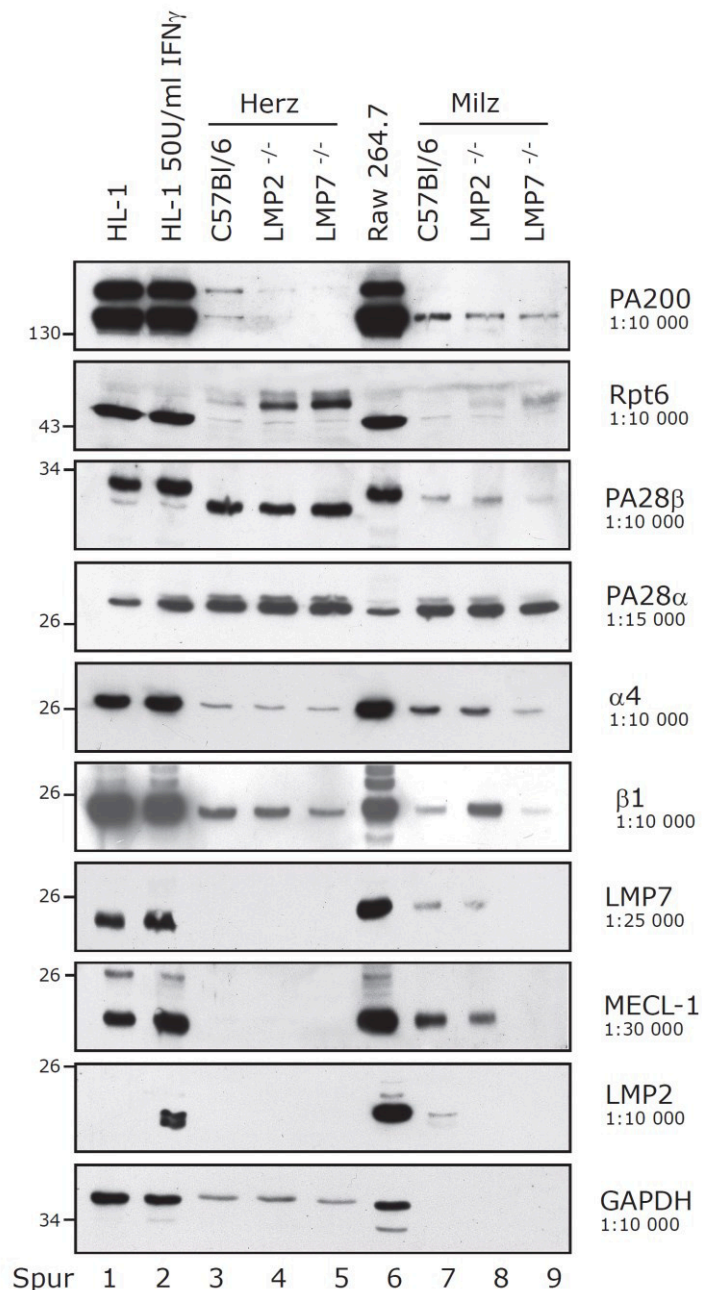
Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sämtliche Proteasomsubkomplexe strukturelle sowie funktionelle Unterschiede zeigen, indem das 30S Proteasom eine effizientere Degradation und Deubiquitinierung als das 26S Proteasom aufweist. Die Analyse von Regulator assoziiertem i20S *core* Komplex zeigt, dass die Inkorporation der Immununtereinheiten die Proteindegradation positiv beeinflussen kann. Sowohl die Bindung, als auch die Hydrolyse von ATP werden für die erfolgreiche Degradation sowie die Deubiquitinierung benötigt.

### **3.6. Analyse der Expression und Inkorporation von proteasomalen Untereinheiten aus Herz- und Milzgewebelysat von C57Bl/6 (WT), LMP2<sup>-/-</sup> und LMP7<sup>-/-</sup> Mäusen**

#### **3.6.1. Analyse der Expression von proteasomalen Untereinheiten in murinen Gewebelysaten**

Im Rahmen dieser Dissertation wurde das Herz- und Milzgewebe von C57Bl/6 (Wildtyp), LMP2 defizienten sowie LMP7 defizienten Mäusen analysiert, um Unterschiede bezüglich der Expression und Assoziation von proteasomalen Komplexen zu analysieren. Diese unterschiedlichen Gewebetypen können Expressionsunterschiede von proteasomalen Untereinheiten aufweisen, die durch die Defizienz der Immununtereinheiten LMP7 oder LMP2 weiter variiert werden.

Raw264.7 Zellen, eine Makrophagenzelllinie aus Balb/c-Mäusen, die mit „*Abelson murine leukemia virus*“ transformiert wurden, eignen sich zum Vergleich mit dem Gewebelysat aus Milz (Raschke et al., 1978). Milzgewebe ist reich an immunrelevanten Zellen wie z.B. dendritische Zellen, Makrophagen und Monocyten. Die Herzmuskelzelllinie HL-1, aus dem murinen „*AT-1 atrial cardiomyocyte tumor*“ gewonnen, kann analog zu Gewebelysaten aus Herz analysiert werden (Claycomb et al., 1998). Eine Stimulation dieser Zelllinien mit IFN $\gamma$  ermöglicht eine Beobachtung der zellulären Adaption an Infektionsbedingungen (vgl. Abb. 3-17).



**Abbildung 3-17 Vergleichende Expression der proteasomalen Untereinheiten in verschiedenen Zelllinien und murinen Gewebelysaten.** Herz- und Milzgewebe im Vergleich zu Raw264.7 Makrophagen und HL-1 Kardiomyozyten.

Eine IFN $\gamma$  Stimulation bewirkt eine intrazelluläre Signalkaskade, die u.a. in der Expression der Immununtereinheiten LMP7, MECL-1 und LMP2 und PA28 $\alpha$  und PA28 $\beta$  Untereinheiten resultiert. Dies trifft für die Kardiomyozytenzelllinie HL-1 zu (vgl. Abb. 3-17, Spur 1 und 2). Die Makrophagenzelllinie Raw264.7 exprimiert diese Untereinheiten auch Stimulations-unabhängig (vgl. Abb. 3-17 Spur 6). Im Herzgewebelysat werden PA28 $\alpha$  und PA28 $\beta$ , aber keine Immununtereinheiten exprimiert (vgl. Abb. 3-17, Spur 3

bis 5). Im Milzgewebe aus nichtinfizierten Mäusen werden sämtliche Immununtereinheiten exprimiert (vgl. Abb. 3-17, Spur 7-9). Hier wird deutlich, dass die Detektion von MECL-1 von der Expression von LMP7 abhängig ist, da im Milzlysats aus LMP7<sup>-/-</sup> Mäusen kein MECL-1 detektiert wird (vgl. Abb. 3-17, Spur 9). Die Expression von LMP2 ist nicht beeinflusst, da es trotz LMP7<sup>-/-</sup> detektiert wird (vgl. Abb. 3-17, Spur 8). Der konstitutive Gegenpart zu LMP2, die katalytische Untereinheit  $\beta 1$ , wird im Milzgewebelysats von LMP2<sup>-/-</sup> Mäusen vermehrt exprimiert, da diese Untereinheit das Fehlen von LMP2 kompensieren muss (vgl. Abb. 3-17, Spur 8). Auch die Untereinheiten PA28 $\alpha$  und PA28 $\beta$  weisen Unterschiede in der Expressionsrate auf. PA28 $\alpha$  wird in allen Tierstämmen exprimiert; PA28 $\beta$  lässt sich in C57Bl/6 und LMP2<sup>-/-</sup> Mäusen detektieren, in LMP7<sup>-/-</sup> Mäusen kaum (vgl. Abb. 3-17, Spur 7 bis 9). PA28 $\beta$  zeigt zwei verschiedene Isoformen, die einen Unterschied in der elektrophoretischen Mobilität aufweisen, was auf eine Phosphorylierung hinweisen kann. In diesem Fall läge PA28 $\beta$  in Herzgewebe unphosphoryliert vor (vgl. Abb. 3-17, Spur 3 bis 5).

Die Untereinheiten  $\alpha 4$  des 20S *core* Komplexes und Rpt6 des 19S Regulators werden IFN $\gamma$ -unabhängig exprimiert. Rpt6 zeigt im Herzgewebelysats eine Bande mit verminderter, elektrophoretischer Mobilität, was auf eine Phosphorylierung zurückgeführt werden kann (vgl. Abb. 3-17, Spur 3 bis 5) (Zhang et al., 2007).

PA200 kann im Milzgewebe der drei Mausstämmen nur als PA200<sub>160kDa</sub>-Isoform detektiert werden. Im Herzgewebe von C57Bl/6 Mäusen lassen sich beide Isoformen beobachten (vgl. Abb. 3-17, Spur 3). Allgemein lässt sich allgemein sehr wenig PA200 beobachten. Vergleicht man die Bandenintensitäten von PA28 $\alpha$  und PA28 $\beta$  mit PA200 zwischen Zell- und Gewebelysaten, unterstreicht die Relation der beiden proteasomalen Komplexpartner die geringe Assoziationsmöglichkeit von 20S mit dem PA200 Monomer in den untersuchten Gewebelysaten. Aus diesen Gründen wird eine Assoziation zwischen dem 20S Proteasom und PA200 in Gewebelysaten im Folgenden vernachlässigt.

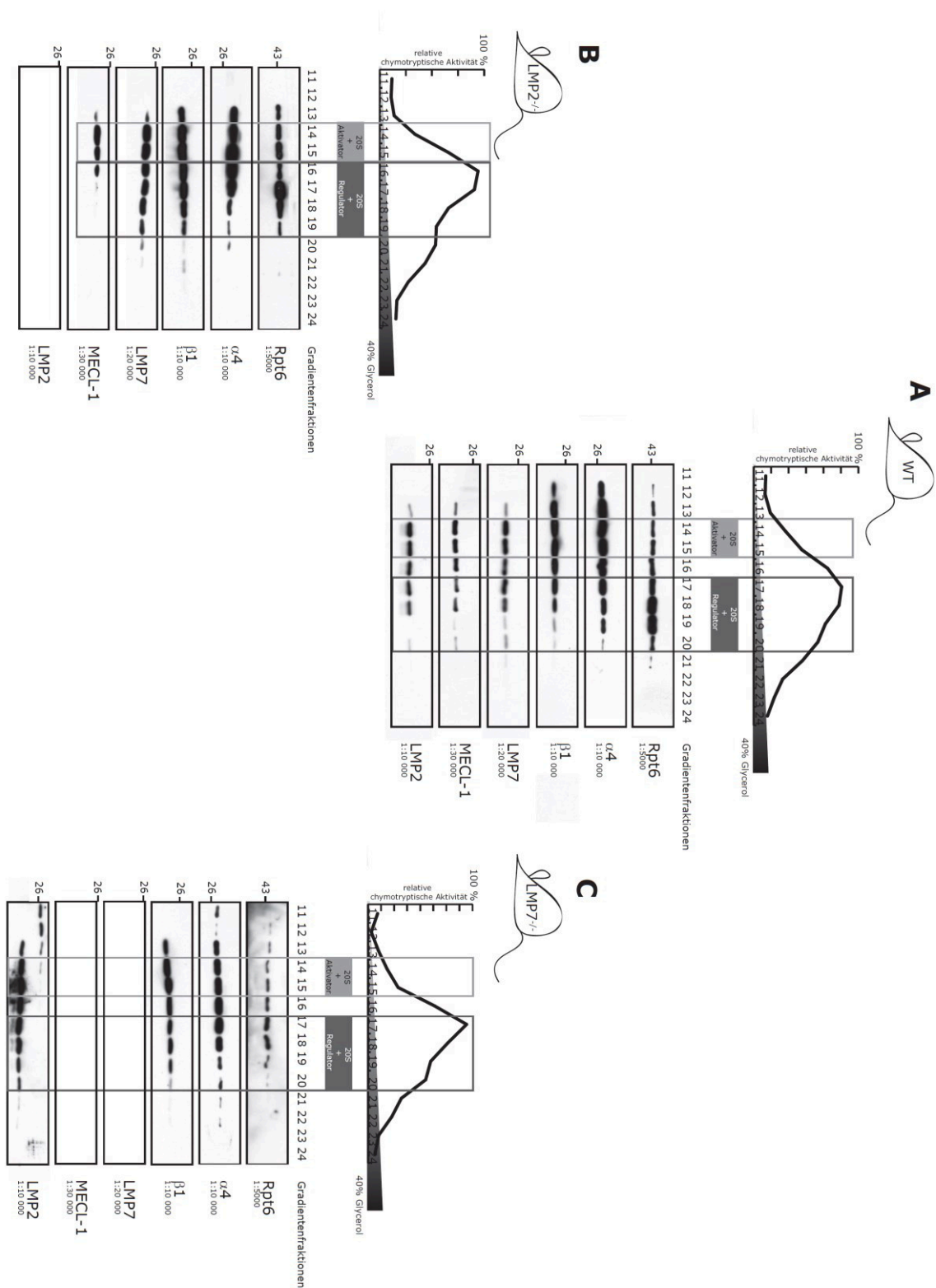


### **3.6.2. Inkorporation der Immununtereinheiten in proteasomale Komplexe (analysiert aus dem Milzgewebelysat von C57Bl/6, LMP2<sup>-/-</sup> und LMP7<sup>-/-</sup> Mäusen)**

Wie in Abbildung 3-17 gezeigt wurde, werden im Milzgewebe aus nichtinfizierten Mäusen Immununtereinheiten sowie PA28 $\alpha$  und PA28 $\beta$  exprimiert. Auch eine Infektion der Wildtypmaus C57Bl/6 verändert die Inkorporation der Immununtereinheiten im Milzgewebe nicht (Dissertation Sandra Jäkel, 2009). Dieser lymphatische Gewebetyp diente deshalb für die Analyse der Inkorporation von Immununtereinheiten in proteasomale Komplexe. Die SDS PAGE einzelner Fraktionen aus der Gradientenzentrifugation ermöglicht eine Analyse der kolokalisierten, und damit wahrscheinlich inkorporierten Immununtereinheiten aus dem Gewebelysat der drei Maustypen C57Bl/6 (WT), LMP2<sup>-/-</sup> und LMP7<sup>-/-</sup> (vgl. Abb. 3-18).

Alle katalytisch aktiven Untereinheiten werden in ihrer maturierten Form detektiert, was für die Inkorporation spricht. Des Weiteren wurden in der denaturierenden Gelelektrophorese einzelne Gradientenfraktionen verwendet. Die detektierte Kolokalisation der Untereinheiten in Fraktionen des entsprechenden Molekulargewichts spricht für eine Inkorporation in hochmolekulare Komplexe. Im Milzgewebelysat aus LMP2<sup>-/-</sup> Mäusen kann sowohl LMP7 als auch MECL-1, sowie die konstitutive Untereinheit  $\beta$ 1 detektiert werden (vgl. Abb. 3-18B). Eine Assemblierung des Intermediärproteasoms ist möglich, da konstitutive und induzierte Untereinheiten im  $\beta$ -Ring kombiniert werden müssen. Diese Aussage lässt sich auch für das Milzgewebelysat aus LMP7<sup>-/-</sup> Mäusen treffen, da weder LMP7 noch MECL-1 detektiert wurde. Die Immununterheit LMP2 muss wahrscheinlich mit  $\beta$ 2 und  $\beta$ 5 in den  $\beta$ -Ring assembliert werden, wobei auch  $\beta$ 1 detektiert wurde und die parallele Assemblierung von konstitutivem 20S Proteasom wahrscheinlich ist (vgl. Abb. 3-18C).



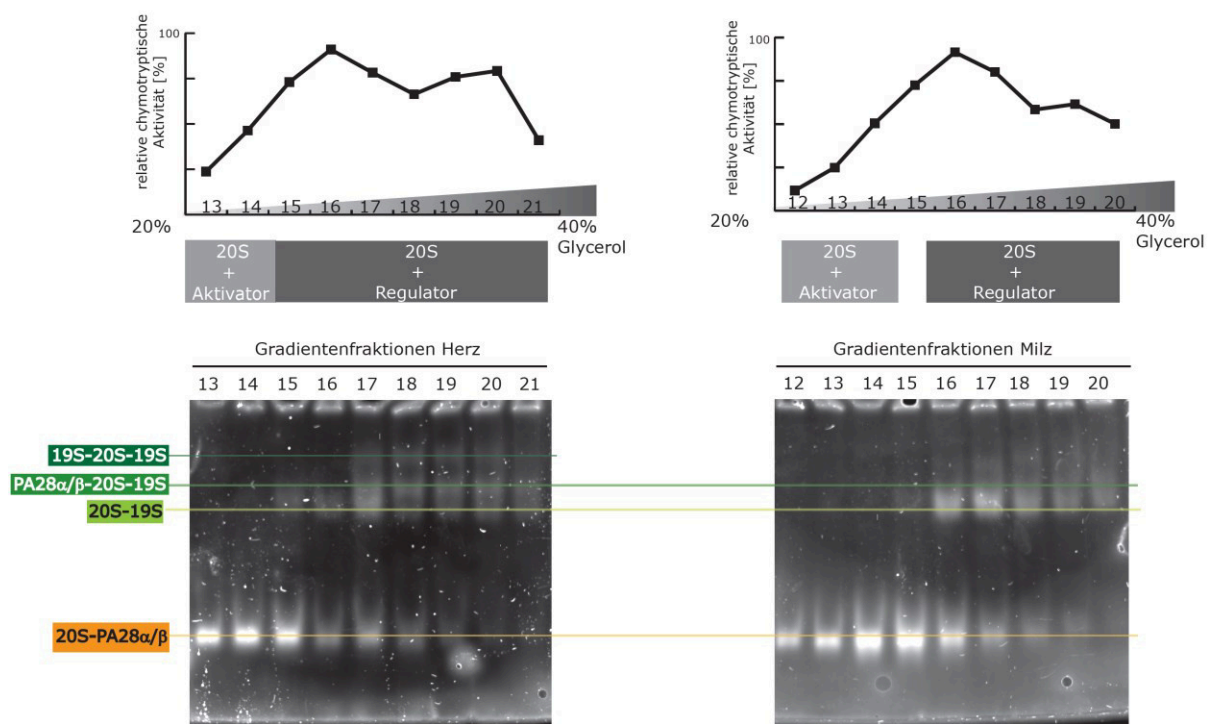


**Abb. 3-18 Vergleichende Komigration der Immununtereinheiten zu Untereinheiten des proteasomalen Grundgerüsts aus dem Gewebe von (A) C57Bl/6, (B) LMP2<sup>-/-</sup> und (C) LMP7<sup>-/-</sup> Mäusen.** Das Totallysat von Milzgewebe aus C57Bl/6, LMP2<sup>-/-</sup> und LMP7<sup>-/-</sup> Mäusen wurde über die Gradientenzentrifugation aufgetrennt. Der Aktivitätsgraph zeigt die relative chymotryptische Aktivität der ausgewählten Fraktionen. Anschließende SDS PAGE der entsprechenden Fraktionen.

### 3.7. Heterogenität der 19S Regulator assoziierten proteasomalen Komplexe in Herz- und Milzgewebelysat von C57Bl/6 Mäusen (WT), LMP2<sup>-/-</sup> Mäusen und LMP7<sup>-/-</sup> Mäusen

#### 3.7.1. Proteasomale Komplexformierung in Herz- und Milzgewebe aus C57Bl/6 Mäusen

Nicht jeder Zelltyp assoziiert sämtliche Komplexsubtypen der Proteasompopulation. Um eventuelle Unterschiede zwischen murinem Herz- und Milzgewebe aus Wildtypmäusen des Stammes C57Bl/6 zu beobachten, wurden die zellulären Proteasomkomplexe mittels Gradientenzentrifugation und anschließender nativen Gelelektrophorese analysiert (vgl. Abb. 3-19).

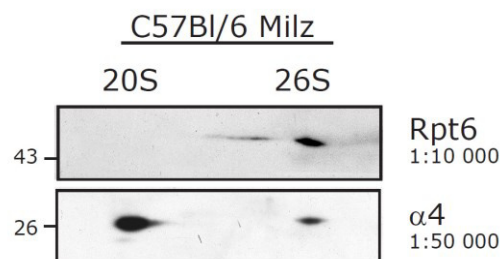


**Abb. 3-19 Unterschiedliche Assemblierung von 26S/Hybrid und 30S im Gewebe aus C57Bl/6 Mäusen.** Das Totallysat von Herzgewebe und Milzgewebe aus C57Bl/6 Mäusen wurde über die Gradientenzentrifugation aufgetrennt. Der Aktivitätsgraph zeigt die relative chymotryptische Aktivität der ausgewählten Fraktionen. Der Substratoverlay zeigt aktive proteasomale Komplexe der entsprechenden Gradientenfraktionen.

Die Abbildung 3-19 zeigt die Fraktionen 12 und 20 bzw. 13 und 21, da dieser Bereich des Dichtegradienten die aktiven proteasomalen Komplexe umfasst. Die Grafik stellt die chymotryptische Aktivität der einzelnen Fraktionen dar.

Der Aktivitätsgraph des aufgetrennten Herzgewebelysates zeigt zwei Aktivitätspeaks, die durch die homogene native PAGE der Gradientenfraktionen als 26S/Hybrid und 30S identifiziert werden können. Fraktion 16 zeigt den höchsten chymotryptischen Substratumsatz und beinhaltet hauptsächlich das 26S Proteasom. Die Fraktionen 17 bis 21 weisen einen Proteasomkomplex mit verminderter elektrophoretischer Mobilität auf, der dem Hybridproteasoms entsprechen könnte. Ab Fraktion 18/19 ist das 30S Proteasom zu erkennen.

Der Aktivitätsgraph aus dem Totallysat von homogenisiertem Milzgewebe zeigt eine ähnliche Verteilung der proteasomalen Komplexe. Auffällig ist, dass im Aktivitätsgraphen nur ein Aktivitätspeak zu erkennen ist. Dieser könnte dem 26S Proteasom entsprechen, wie die native PAGE zeigt. Da in den Fraktionen 16 bis 19 kein weiterer Proteasomsubtyp nachgewiesen werden kann, legt das die Vermutung nahe, dass es sich in diesem Fall um 26S, ohne assoziierten Aktivator, handelt. Betrachtet man das Aktivitätsprofil und die native PAGE im Bereich der Fraktionen 19 und 20 fällt die Abwesenheit von 30S auf. Trotz der Instabilität dieses Komplextyps müsste die native PAGE Signale zeigen, sofern das 30S Proteasom assembliert wird. Da allerdings auch der Aktivitätsgraph keinen Peak in diesem Fraktionsbereich zeigt, kann davon ausgegangen werden, dass das 30S Proteasom nur geringfügig assembliert wird oder inaktiv vorliegt. Die vertikale native 2D PAGE bestätigt, dass die Assemblierung des 30S Proteasoms reduziert ist (vgl. Abb. 3-20).



**Abb. 3-20** Die Zellen des Milzgewebes assoziieren mehrheitlich Aktivator assoziiertes 20S und 26S. vertikale native 2D PAGE von Milzgewebelysate aus C57Bl/6 Mäusen.

Der gegen die proteasomale Untereinheit  $\alpha 4$  gerichtete Antikörper kann zwei Proteinbanden detektieren: es handelt sich dabei um das „Aktivator assoziierte 20S Proteasom“ und „26S/Hybrid“, was durch die parallele Detektion von Rpt6 bestätigt wird. Das Fehlen einer weiteren Bande mit einer Kodetektion von  $\alpha 4$  und Rpt6 kann mit einer verminderten Assoziation des 30S Proteasoms erklärt werden (vgl. 3-6B: vertikale native 2D PAGE von C4 Fibroblasten zeigt die Detektion von 30S).

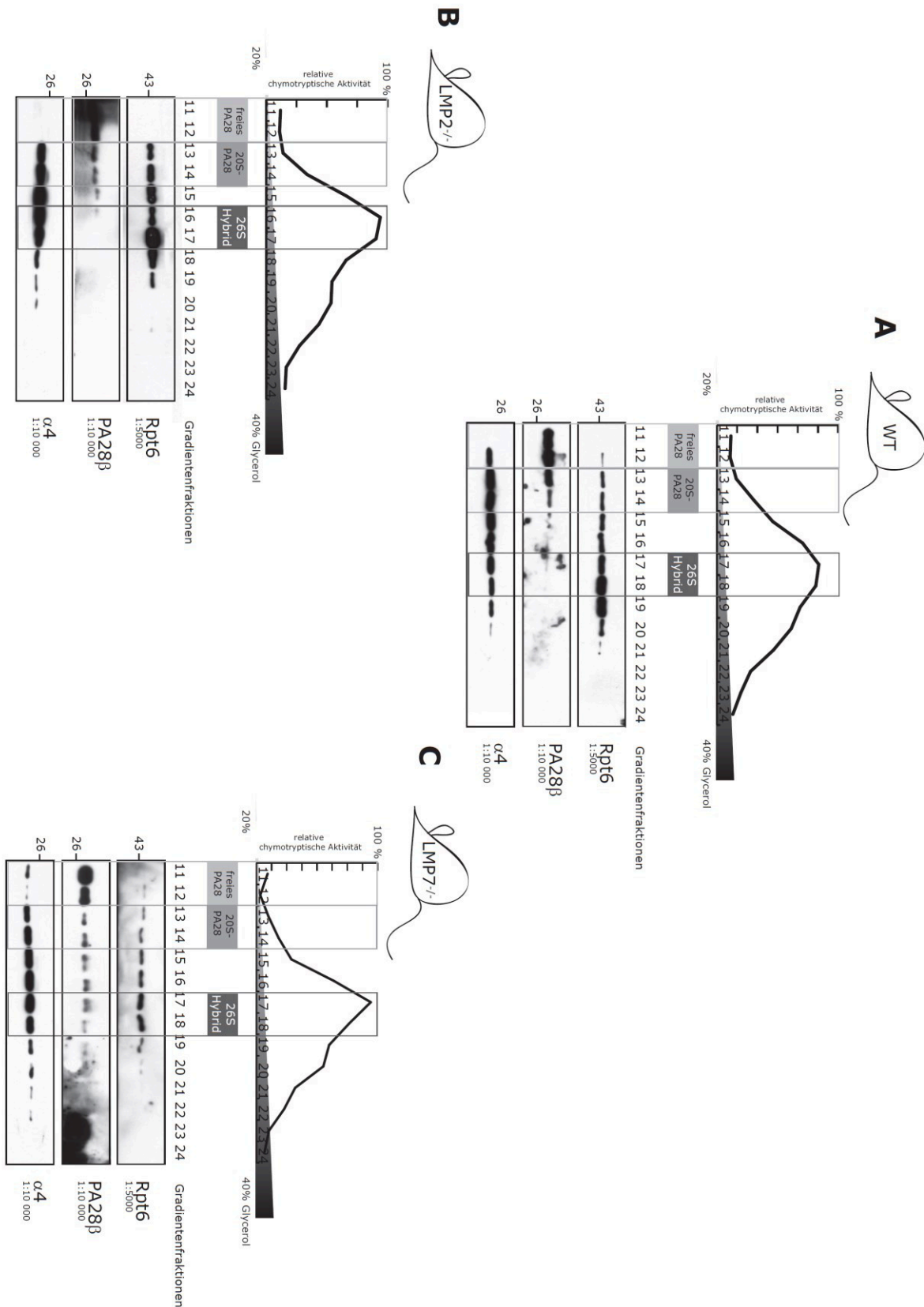
Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Gewebetypen eine heterogene Komplexassoziation aufweisen:

- Im Herzgewebe können das „Aktivator assoziierte 20S Proteasom“, 26S/Hybrid und 30S Proteasom beobachtet werden.
- Im Milzgewebe lassen sich lediglich „Aktivator assoziiertes 20S Proteasom“ und „26S/Hybrid“ detektieren, wobei dieser hochmolekulare Komplex im folgenden Kapitel näher beschrieben wird.

### **3.7.2. Identifikation des 26S/Hybridproteasoms aus dem Gewebelysat von C57Bl/6, LMP2<sup>-/-</sup> und LMP7<sup>-/-</sup> Mäusen**

#### **Murines Milzgewebelysat**

In Abb. 3-19 wurde gezeigt, dass in Zellen des Milzgewebes „26S/Hybrid“ assembliert wird. Ob es sich um 19S Regulator assoziiertes 20S Proteasom (26S) oder PA28 $\alpha/\beta$  Aktivator und 19S Regulator assoziiertes 20S Proteasom (Hybrid) handelt, kann mit der nativen Gelelektrophorese nicht belegt werden (vgl. Abb. 3-19). Die Identifikation erfolgte somit in murinen Milzgewebelysaten aus C57Bl/6, LMP2<sup>-/-</sup> und LMP7<sup>-/-</sup> Mäusen. Die Lysate wurden auf einen 20-40% Glycerolgradient aufgetragen, ultrazentrifugiert, fraktioniert und mittels anschließender SDS PAGE analysiert (vgl. Abb. 3-21).

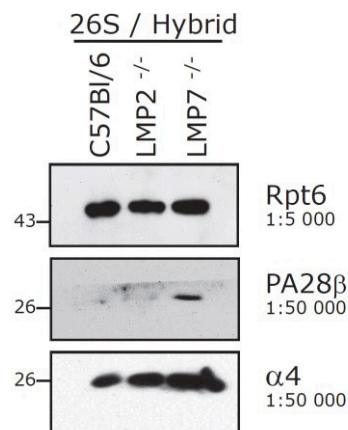


**Abb. 3-21 Die unterschiedliche Assemblierung von „26S/Hybrid“ ist abhängig von der LMP7 Defizienz.** Das Totallysat von Milzgewebe aus C57Bl/6, LMP2<sup>-/-</sup> und LMP7<sup>-/-</sup> Mäusen wurde über die Gradientenzentrifugation aufgetrennt. Der Aktivitätsgraph zeigt die relative chymotryptische Aktivität der ausgewählten Fraktionen. Anschließende SDS PAGE der entsprechenden Fraktionen.

Die Analyse der Gradientenfractionen mittels SDS PAGE zeigt im Milzgewebelysat aus LMP7<sup>-/-</sup> Mäusen eine erhöhte Assemblierung von PA28 $\alpha/\beta$  assoziiertem Hybridproteasom, da PA28 $\beta$  im Bereich des Aktivitätsmaximums, dem 26S/Hybrid Proteasom zugeordnet, beobachtet werden kann. Im Milzgewebelysat der LMP2<sup>-/-</sup> Mäuse sowie C57Bl/6 Wildtypmäuse assoziiert das 20S Proteasom wahrscheinlich nur mit dem 19S Regulator, es wird der 26S Komplex assoziiert. In den höheren Fraktionen (ab Fraktion 16/17) kann kaum PA28 $\beta$  detektiert werden. Der Molekulargewichtsbereich des „Aktivator assoziierten 20S Proteasoms“ zeigt im Gegensatz dazu keine Unterschiede in der Assoziation von 20S-PA28 $\alpha/\beta$  (vgl. Abb. 3-21; Fraktionen 13+14).

Diese ersten Beobachtungen können durch die horizontale native 2D PAGE bestätigt werden (vgl. Abb. 3-22).

#### **horizontale native 2D PAGE**



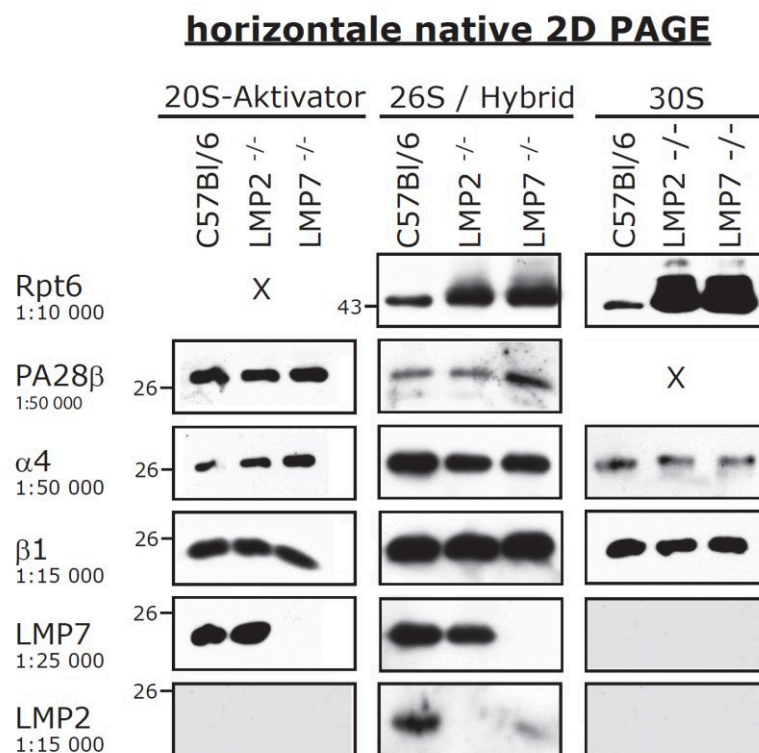
**Abb. 3-22 Die Assemblierung von „26S/Hybrid“ ist abhängig von der LMP7 Defizienz.** horizontale native 2D PAGE des „26S/Hybrids“ von Milzgewebelysat aus C57Bl/6, LMP2<sup>-/-</sup> und LMP7<sup>-/-</sup> Mäusen.

Auch diese Charakterisierungsmethode kann im Milzgewebelysat aus LMP7<sup>-/-</sup> Mäusen die Kolo-kalisation von PA28 $\beta$ , der proteasomalen Untereinheit  $\alpha$ 4 und der Untereinheit Rpt6 des 19S Regulators nachweisen. Die Ausbildung von PA28 $\alpha/\beta$  assoziiertem Hybridproteasom ist wahrscheinlich. In Milzgewebelysaten aus LMP2<sup>-/-</sup> oder C57Bl/6 Mäusen kann PA28 $\beta$  nur minimal detektiert werden, was für eine geringe Ausbildung

von PA28 $\alpha/\beta$ -Hybridproteasom spricht. Als alternativer Komplex wird vermutlich das 26S Proteasom assembliert.

### Murines Herzgewebe

Die bei einer LMP7 Defizienz beobachtete induzierte Assemblierung von Hybridproteasom lässt sich auch in der Analyse von murinem Herzgewebe detektieren. Mittels der horizontalen nativen 2D PAGE von Herzgewebelysat der drei verschiedenen Mausstämmen C57BL/6, LMP2<sup>-/-</sup> und LMP7<sup>-/-</sup> wurden nieder- und hochmolekulare proteasomale Komplexe miteinander verglichen (vgl. Abb. 3-23).



**Abb. 3-23 Die Assemblierung von „26S/Hybrid“ ist abhängig von der LMP7 Defizienz.** horizontale native 2D PAGE des „Aktivator assoziierten 20S core Komplexes, des „26S/Hybrids“ und des 30S Proteasoms von Milzgewebelysat aus C57BL/6, LMP2<sup>-/-</sup> und LMP7<sup>-/-</sup> Mäusen.

Das „Aktivator assoziierte 20S Proteasom“ kann als 20S-PA28 $\alpha/\beta$  identifiziert werden, wobei diese Assoziation keine Unterschiede in den untersuchten Herzgewebelysaten



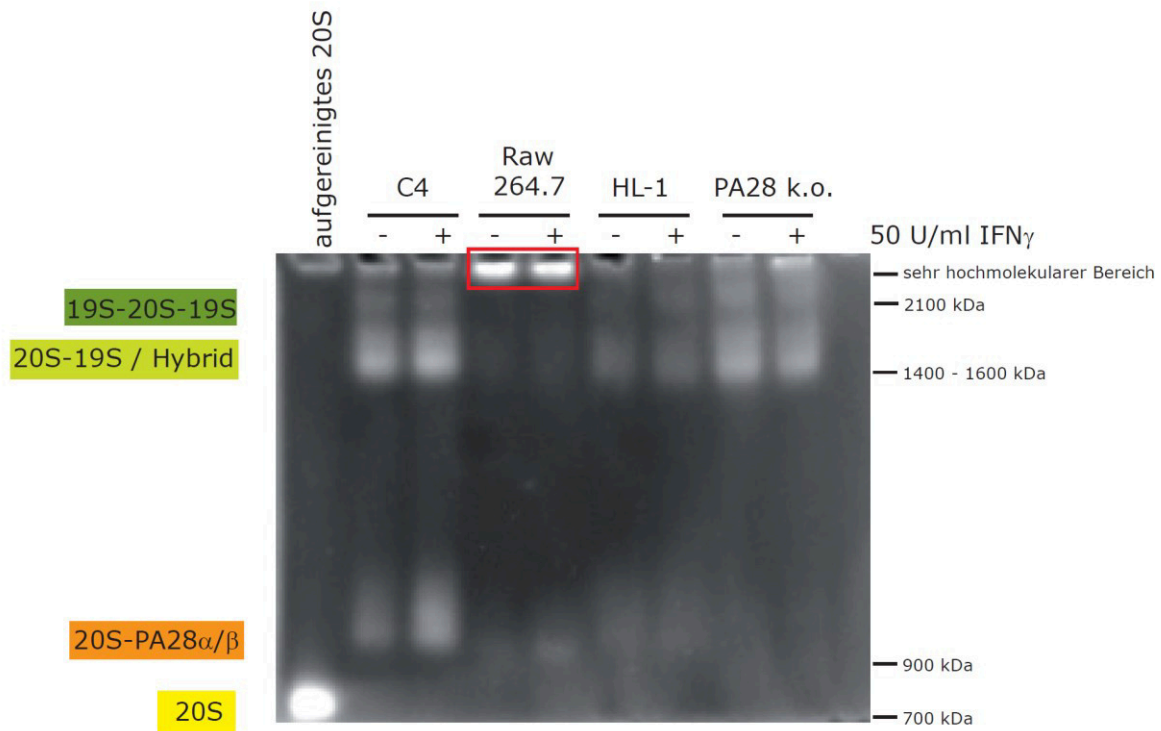
zeigt. Im Bereich des 26S/Hybrid lässt sich in allen Lysaten PA28 $\alpha/\beta$ -assoziiertes 20S Proteasom finden, wobei die PA28 $\alpha/\beta$ -Assoziation in LMP7<sup>-/-</sup> Mäusen erhöht ist. Das PA28 $\alpha/\beta$ -Hybridproteasom weist selbst in nichtinfizierten Mäusen eine Inkorporation der Immununtereinheiten auf. LMP7 wird exprimiert und inkorporiert, wohingegen LMP2 in Lysaten aus Wildtypmäusen deutlich, in Lysaten aus LMP7<sup>-/-</sup> Mäusen mit verminderter Intensität im 20S *core* Komplex beobachtet werden kann (vgl. Abb. 3-23).

Schlussfolgernd lässt sich sagen, dass die fehlende Expression und damit verbundene fehlende Inkorporation von LMP7 zu einer erhöhten Assoziation des proteasomalen Aktivators PA28 $\alpha/\beta$  führen kann. Diese Beobachtung ist auf den proteasomalen Komplextyp 26S/Hybrid limitiert, weil das „Aktivator assoziierte 20S Proteasom“ in allen drei Maustypen eine PA28 $\alpha/\beta$  Assoziation aufweist (vgl. Abb. 3-23).

### **3.8. Identifizierung weiterer proteasomaler Assoziationspartner**

Wie schon zuvor gezeigt wurde, lässt sich in jeder Zelllinie eine spezifische Proteasompopulation beobachten. Eine Auswahl dieser Vielfalt lässt sich in C4 Fibroblasten, HL-1 Kardiomyozyten, PA28<sup>-/-</sup> MEFs und Raw264.7 Makrophagen mittels der nativen Gelelektrophorese darstellen (vgl. Abb. 3-24).





**Abb. 3-24** Proteasomale Komplexe aus Raw264.7 Makrophagen besitzen eine verminderte Aktivität und zeigen eine hochmolekulare, aktive Protease. Chymotryptischer Substratoverlay der homogenen nativen PAGE des Totallysates von C4 Fibroblasten, Raw264.7 Makrophagen, HL-1 Kardiomyozyten und PA28<sup>-/-</sup> MEFs.

In dem Totallysat von C4 Fibroblasten, HL-1 Kardiomyozyten und den PA28<sup>-/-</sup> MEFs können die bereits beschriebenen Komplexe „Aktivator assoziiertes 20S Proteasom“, das 26S/Hybrid und das 30S Proteasom detektiert werden. Im Lysat von Raw264.7 können kaum aktive, proteasomale Komplexe beobachtet werden; die Proteinmenge, die auf das native Gel aufgetragen wurde, betrug allerdings jeweils 40 $\mu$ g. Auffallend ist jedoch, dass im Totallysat von Raw264.7 Makrophagen aktive Komplexe detektiert werden können, die ein Molekulargewicht aufweisen, welches die Masse eines 30S Komplexes (2100 kDa) weit übersteigt. Dieser aktive Komplex kann im nativen Gel nicht elektrophoretisch aufgetrennt werden.

Um diesen chymotryptisch aktiven Komplex in Bezug auf proteasomale Untereinheiten zu charakterisieren, erfolgte eine Analyse mittels vertikaler nativer 2D PAGE (vgl. Abb. 3-25).

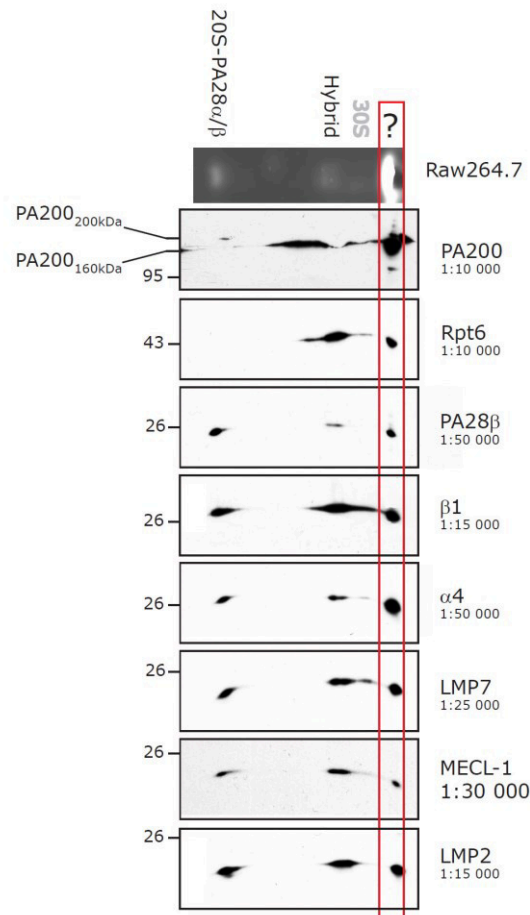


Abb. 3-25 Analyse der hochmolekularen, chymotryotisch aktiven Bande im Lysat aus Raw264.7 Makrophagen. (Vertikale native 2D PAGE aus Raw264.7 Makrophagen). Vertikale native 2D PAGE des Totallysates von Raw264.7 Makrophagen.

In der vertikalen nativen 2D PAGE konnten viele proteasomale Untereinheiten detektiert werden. Es lassen sich Proteine des 20S *core* Komplexes sowie des 19S Regulators und der Aktivatoren PA28 $\alpha/\beta$  und PA200 detektieren (vgl. Abb. 3-25).

### Massenspektrometrische Analyse

Da die proteasomalen Untereinheiten in dem sehr hochmolekularen Bereich detektiert wurden, der den Molekulargewichtsbereich eines 30S Proteasoms weit übersteigt, besteht die Möglichkeit, dass weitere Proteine am Proteasom assoziiert sind. Um diese alternativen oder additiven Komplexpartner zu ermitteln wurde das Gelfragment, welches

den sehr hochmolekularen Bereich beinhaltet, per Massenspektrometrie untersucht und ergab die in Tabelle 2 aufgeführten potentiellen Assoziationsfaktoren.

Gruppe	Protein	Molekulargewicht
Elongationsfaktoren	Elongationsfaktor 2, 1 $\alpha$ , 1 $\gamma$	90 kDa
Hitzeschockproteine	Hsp70, Hsp90 $\alpha$ , Hsp90 $\beta$	70 bzw. 90 kDa
Chaperonin	T-complex protein 1 $\eta, \beta, \alpha, \epsilon, \delta, \xi, \gamma$	58 kDa
Proteasom	20S Untereinheiten, 19S Untereinheiten	20-26 kDa, 45-105 kDa
Ribosom	60S und 40S ribosomale Proteine	20 kDa

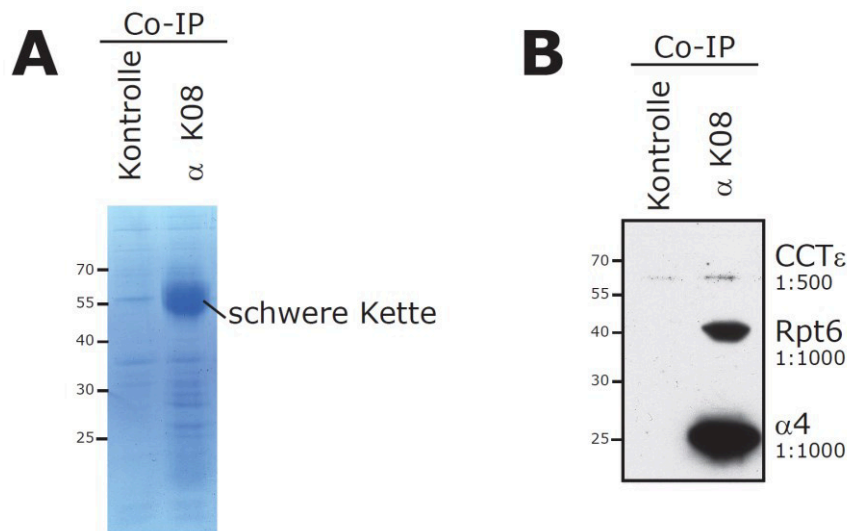
**Tabelle 3-1 Massenspektrometrisch analysierte Proteine aus dem extrahierten, sehr hochmolekularen Bereich der homogenen nativen Gelelektrophorese** (ausführliche Tabelle im Anhang 1).

In der massenspektrometrischen Analyse werden viele proteasomale Untereinheiten, sowie Untereinheiten des 19S Regulators detektiert. Dies ist analog zu der vertikalen nativen 2D PAGE, in der die proteasomalen Untereinheiten und die ATPase Rpt6 beobachtet wurden (vgl. Abb. 3-25).

Die Proteingruppen von Elongationsfaktoren, Hitzeschockproteinen und das Chaperonin T-Komplex könnten auf Grund einer unspezifischen Kolokalisation nachgewiesen worden sein. Eine Interaktion wäre jedoch auch möglich. Die Elongationsfaktoren EF1 $\alpha$ , EF2 und das Chaperon Hsp70 konnten bereits als proteasomal assoziiert nachgewiesen werden (Besche et al., 2009).

Die Detektion von ribosomalen Proteinen kann entweder mit einer Komigration im nativen Gel erklärt werden, da dieser makromolekulare Komplex ein Molekulargewicht von 4,2 MDa aufweist, oder mit der Assoziation zwischen Polyribosomen und dem Proteasom begründet werden, da ebenfalls neun verschiedene t-RNA-Ligasen und poly-A-bindende Proteine detektiert wurden (vgl. Anhang 1). Eine massenspektrometrische Analyse von Affinitäts-gereinigten Proteasomen konnte eine Interaktion zwischen Proteasom und Ribosom bereits darstellen (Verma et al., 2000).

Um eine mögliche Interaktion zwischen dem Proteasom und einem interessanten neuen Faktor, dem Chaperonin TriC/CCT, nachzuweisen, wurde das 20S Proteasom unter schonenden Bedingungen aus dem Totallysat von Raw264.7 Zellen präzipitiert und zunächst per Western Blot analysiert. Eine mögliche Kopräzipitation von TriC wurde mit der Verwendung von spezifischen Antikörpern überprüft (vgl. Abb. 3-26).



**Abb. 3-26 Die TriC-Untereinheit CCTε kann über eine Co-Immunopräzipitation am 19S-20S Proteasom detektiert werden. Interaktionspartner des 20S Proteasoms. A** Coomassie gefärbte Membran (entspricht dem Coomassie gefärbten SDS Gel). Aufgetragene Proben entstammen der Co-Immunopräzipitation mittels des Antikörpers K08 ( $\alpha$ 20S core Komplex) aus dem Totallysat von Raw264.7 Makrophagen. **B** Immunoblot gegen Untereinheiten des 20S core Komplexes ( $\alpha$ 4), des 19S Regulators (Rpt6) und des Chaperonins TriC (CCTε).

Der präzipitierende Antikörper K08 bindet an mehrere Untereinheiten des 20S core Komplexes. Die Untereinheit  $\alpha$ 4 des 20S Proteasoms kann diese Präzipitation stellvertretend nachweisen. Die Detektion der ATPase Rpt6 des 19S Regulators zeigt die Kopräzipitation des 19S Regulators. Die massenspektrometrische Analyse ergab eine Kolo-kalisation des TriC Komplexes (vgl. Tab 3-2). Die Detektion der TriC-Untereinheit CCTε im Immunoblot bestätigt eine mögliche Interaktion, die bereits in Goldfisch-Oozyten aufgezeigt wurde (vgl. Abb. 3-26) (Tokumoto et al., 2000).

Neben der Detektion im Western Blot wurde dieser Versuchsansatz verwendet, um das Coomassie gefärbte SDS-Gel auch per Massenspektrometrie zu analysieren (vgl. Abb. 3-26).

Proteinname		Mascot Score	MW	Peptide	Sequenz [%]
<b>20S Proteasom</b>					
P49722 Proteasome subunit alpha type-2	$\alpha 2$	518	25909	8	39
O70435 Proteasome subunit alpha type-3	$\alpha 3$	471	28387	10	42
P99026 Proteasome subunit beta type-4	$\beta 4$	378	29097	10	39
O35955 Proteasome subunit beta type-10	$\beta 2$	352	29045	5	22
O09061 Proteasome subunit beta type-1	$\beta 1$	348	26355	7	38
Q9Z2U0 Proteasome subunit alpha type-7	$\alpha 7$	348	27838	11	48
Q9Z2U1 Proteasome subunit alpha type-5	$\alpha 5$	339	26394	5	28
Q9R1P4 Proteasome subunit alpha type-1	$\alpha 1$	322	29528	7	30
Q9R1P0 Proteasome subunit alpha type-4	$\alpha 4$	313	29452	7	19
Q9R1P1 Proteasome subunit beta type-3	$\beta 3$	252	22949	4	23
Q9QUM9 Proteasome subunit alpha type-6	$\alpha 6$	233	27355	3	17
Q9R1P3 Proteasome subunit beta type-2	$\beta 2$	129	22892	3	19
<b>20S Aktivator PA28<math>\alpha/\beta</math></b>					
P97371 Proteasome activator complex subunit 1	PA28 $\alpha$	657	28655	13	56
P97372 Proteasome activator complex subunit 2	PA28 $\beta$	493	27040	11	44
<b>19S Regulator</b>					
Q8BG32 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 11	Rpn11	651	47407	10	24
P62334 26S protease regulatory subunit 10B	Rpt4	629	44145	8	23
Q9D8W5 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 12	Rpn12	400	52861	6	17
Q8VDM4 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2	Rpn2	354	100139	8	10
P62196 26S protease regulatory subunit 8	Rpt6	231	45597	7	23
P46471 26S protease regulatory subunit 7	Rpt1	210	48617	4	12
Q8BJY1 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 5	Rpn5	160	55937	4	9
P14685 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 3	Rpn3	118	60680	3	6
P54775 26S protease regulatory subunit 6B	Rpt3	104	47379	3	8
<b>Chaperonin: TRiC = Chaperonin containing T-complex</b>					
P80315 T-complex protein 1 subunit delta	CCT4 = TCP $\delta$	489	58030	12	18
P11983 T-complex protein 1 subunit alpha	CCT1 = TCP $\alpha$	446	60411	9	16
P80318 T-complex protein 1 subunit gamma	CCT3 = TCP $\gamma$	411	60591	9	17
P80316 T-complex protein 1 subunit epsilon	CCT5 = TCP $\epsilon$	409	59586	10	20
P42932 T-complex protein 1 subunit theta	CCT8 = TCP $\theta$	393	59518	8	14
P80314 T-complex protein 1 subunit beta	CCT2 = TCP $\beta$	382	57441	12	27
P80313 T-complex protein 1 subunit eta	CCT7 = TCP $\eta$	292	59614	7	16
P80317 T-complex protein 1 subunit zeta	CCT6 = TCP $\zeta$	252	57968	7	12
<b>Chaperone</b>					
P11499 Heat shock protein HSP 90-beta	Hsp90 $\alpha$	1631	83229	27	36
P07901 Heat shock protein HSP 90-alpha	Hsp90 $\beta$	1466	84735	23	30
P63017 Heat shock cognate 71 kDa protein	Hsp70	308	70827	7	13
<b>Elongationsfaktoren</b>					
P58252 Elongation factor 2	EF2	246	95253	5	6
P10126 Elongation factor 1-alpha 1	EF1 $\alpha$	198	50082	3	7

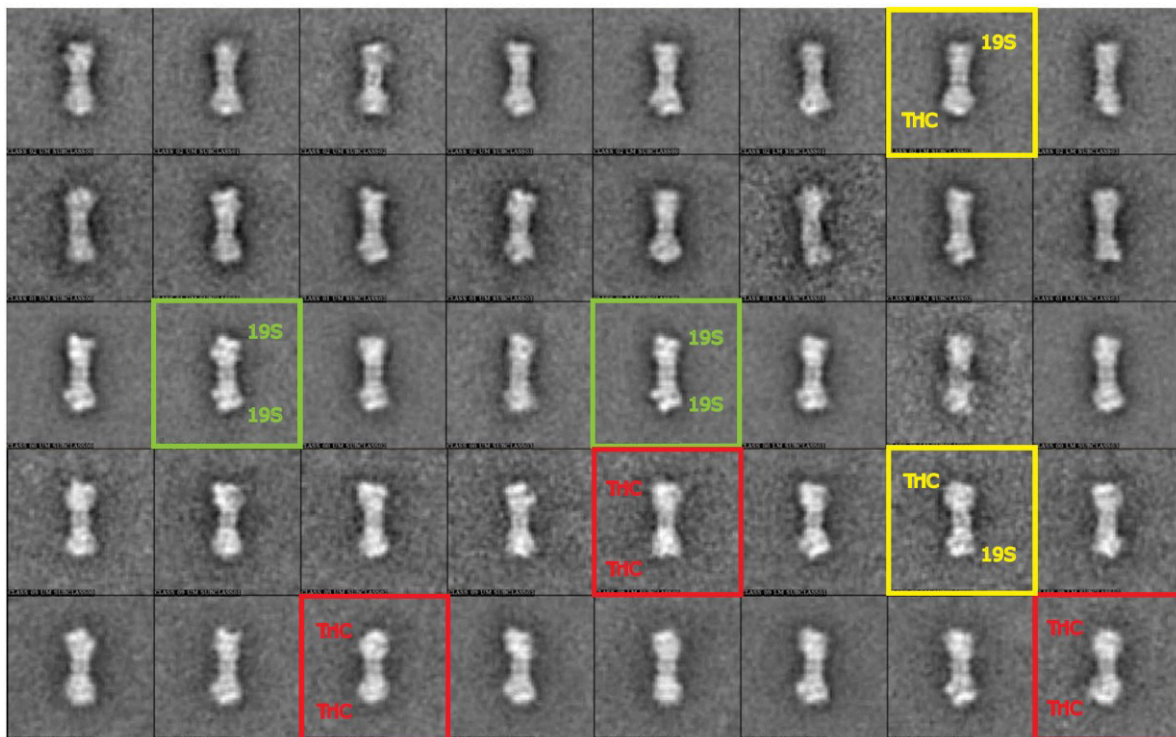
Tabelle 3-2 Massenspektrometrische Daten nach der Analyse einer CoIP aus Raw264.7 Totallysat mittels Antikörper K08 (ausführliche Tabelle im Anhang 2).

Der *pull down* mit K08 präzipitiert neben proteasomalen Komplexe auch die Elongationsfaktoren, die Hitzeschockproteine und das Chaperonin TriC. In Studien an Goldfisch-Oozyten konnte nachgewiesen werden, dass das 26S Proteasom an die Untereinheit CCT $\epsilon$  bindet (Tokumoto et al., 2000). In der vorliegenden massenspektrometrischen Analyse können neben dieser Untereinheit auch die anderen Untereinheiten CCT $\alpha$ , CCT $\beta$ , CCT $\gamma$ , CCT $\delta$ , CCT $\eta$ , CCT $\zeta$  und CCT $\theta$  signifikant detektiert werden. Dies erhöht die Wahrscheinlichkeit einer Assoziation zwischen proteasomalen Komplexen und des TriC-Komplexes, der aus acht verschiedenen Untereinheiten besteht, die sich in zwei Ringen übereinander legen (Leitner et al., 2012).



### Elektronenmikroskopische Analyse

Um zu überprüfen, ob es sich tatsächlich um eine TriC-Assoziation handelt, wurden elektronenmikroskopische Aufnahme von proteasomalen Komplexen mittels *negative stain* – einer Schwermetallfärbung mit Uranylacetat – durchgeführt. Nach einer Modifikation der Gradientenzentrifugation auf 10-40% Sucrose und einer Verkürzung der Laufzeit auf 14h bei 22500rpm wurde eine Fraktion gewählt, die potentielle TriC-assoziierte 20S *core* Komplexe oder TriC-assoziiertes 26S Proteasom enthalten könnte. Diese Probe wurde mit Uranylacetat gefärbt und im Elektronenmikroskop betrachtet. Die Aufnahmen erfolgten in der Gruppe „Elektronenmikroskopie“ von Dr. Thorsten Mielke mit Jörg Bürger am Max Planck Institut für Molekulare Genetik. Die Auswertung übernahm Dr. Elmar Behrmann, Institut für Biophysik, Charité Berlin. Die Partikelbilder wurden gegen eine 3D Referenzstruktur des 30S Proteasoms aligniert, aufsummiert und klassifiziert (vgl. Abb. 3-27).



**Abb. 3-27 Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Seitenansicht detektierter Partikel (*negative stain*) aus einer Gradientenfraction von aufgereinigtem Raw264.7 Totallysat.** Klassensummen ausgewählter Bilder von *negativ-stain* Partikeln nach Alignierung gegen eine 26S 3D Referenzstruktur. Die Alignierung erfolgte mittels *template-matching*. Dabei wurden simulierte 2D Transmissionsbilder von der 3D Referenzstruktur erzeugt, die dann mit den experimentellen Partikelbildern verglichen wurden. Zur Minderung des Signal-zu-Rausch Verhältnisses werden ähnliche 2D Transmissionsbilder gruppiert und aufsummiert. Anschließende Klassifikation der alignierten Bilder per *K-means* Verfahren (Dr. Elmar Behrmann, Institut für Biophysik, Charité Berlin).

Die Schwierigkeit bei der Interpretation der elektronenmikroskopischen Aufnahmen besteht in der Ähnlichkeit zwischen einem assoziierten 19S Regulator und einem potentiell assoziierten Chaperonin TriC. Unter der 21500x Auflösung lassen sich eindeutig 30S Komplexe (19S-20S-19S) erkennen (grün), die sich durch eine seitliche Ansicht kennzeichnen. Eine Rotation des Komplexes kann eine veränderte Ansicht präsentieren. Dabei könnte es sich jedoch auch um eine TriC-Assoziation handeln, welches vergleichbar zu dem 19S Regulator mit den proteasomalen  $\alpha$ -Untereinheiten assoziieren würde (rot). Nach der parallelen Detektion von 20S- und 19S-Untereinheiten in der vertikalen nativen 2D PAGE (vgl. Abb. 3-25) ist es auch möglich, dass ein 20S *core* Komplex sowohl mit einem 19S Regulator als auch mit dem Chaperonin TriC assoziiert (gelb).

## 4 Diskussion

### 4.1. Der 20S *core* Komplex – eine hochvariable Protease

Unter physiologischen Bedingungen kommt es zu einer stetigen Expression der konstitutiven proteasomalen Untereinheiten  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  und  $\beta 5$ , während eine  $\text{IFN}\gamma$  Stimulation die Expression der proteasomalen Immununtereinheiten  $i\beta 1$  (LMP2),  $i\beta 2$  (MECL-1) und  $i\beta 5$  (LMP7) initiiert (Aki et al., 1994; Groettrup et al. 1996). Diese Expression und Inkorporation der induzierbaren  $\beta$ -Untereinheiten konnte auch für die hier untersuchten, murinen nicht-lymphoiden Zelllinien C4 Fibroblasten und HL-1 Kardiomyozyten bestätigt werden (vgl. Abb. 3-4 und 3-17). Lymphoide Zellen, wie Monocyten und Makrophagen, exprimieren auch ohne Stimulation die proteasomalen Immununtereinheiten, was für die untersuchte, murine Makrophagen-ähnliche Zelllinie Raw264.7 bestätigt wurde (vgl. Abb. 3-17).

Die katalytischen Untereinheiten werden allerdings nicht am bestehenden 20S *core* Komplex ausgetauscht, sondern während der *de novo* Synthese in das i20S Proteasom inkorporiert. Allgemein zeigt das proteasomale Maturierungsprotein POMP, ein essentieller Faktor der Biogenese, eine höhere Affinität zu LMP7, wodurch die Inkorporation dieser Untereinheit dem Einbau von  $\beta 5$  vorgezogen wird. Das Immunoproteasom kann so schneller assembliert werden und das c20S Proteasom wird nahezu nicht mehr assembliert (Heink et al., 2005; Murata, Yashiroda & Tanaka, 2009).

Die Detektion von  $\beta 1$  in der nativen 2D PAGE des Zellextraktes von C4 Fibroblasten zeigt jedoch, dass die konstitutive Untereinheit auch nach einer  $\text{IFN}\gamma$  Stimulation exprimiert und inkorporiert wird; die Detektion ist allerdings reduziert (vgl. Abb. 3-4 und 3-6). Dies trifft auch für  $\beta 2$  und  $i\beta 2$  zu: der gegen MECL-1 gerichtete Antikörper detektiert nach einer 24stündigen  $\text{IFN}\gamma$  Stimulation die Immununtereinheit sowie den konstitutiven Gegenpart (vgl. Abb. 3-4 und 3-6). Das kann durch die unterschiedlichen Halbwertszeiten



des konstitutiven Proteasoms und des Immunoproteasoms erklärt werden. Der i20S *core* Komplex ist bereits nach 27h zu 50% abgebaut. Der c20S *core* Komplex weist mit 133h eine weitaus längere Halbwertszeit auf (Heink et al., 2005). Dies erklärt die parallele Detektion von Standard- und Immununtereinheiten nach einer 24stündigen IFN $\gamma$  Stimulation.

Daneben besteht auch die Möglichkeit der parallelen Assemblierung von intermediären 20S *core* Komplexen, welche konstitutive und Immununtereinheiten kombinieren und teilweise ein Drittel oder sogar die Hälfte der Proteasompopulation darstellen (Dahlmann et al. 2000; Goldberg, 2007; Guillaume et al., 2010). Dies ist für die untersuchten C4 Fibroblasten, die HL-1 Kardiomyozyten als auch die Raw264.7 Makrophagen möglich (vgl. Abb. 3-4, 3-6, und 3-17). Eine genaue Deskription der Intermediärsubtypen war mit den durchgeführten Analysemethoden aber nicht möglich.

Die Analyse der Milzgewebelysate der drei verschiedenen Mauslinien C57Bl/6 (WT), LMP2<sup>-/-</sup> und LMP7<sup>-/-</sup> ermöglichte allerdings die Detektion von spezifischen, intermediären Subtypen:

- $\beta$ 1 – MECL-1 – LMP7 *core* Komplex (vgl. Abb. 3-18B) (LMP2<sup>-/-</sup> Maus)
- LMP2 –  $\beta$ 2 –  $\beta$ 5 *core* Komplex (vgl. Abb. 3-18C) (LMP7<sup>-/-</sup> Maus)

Opitz et al. konnten zeigen, dass das Herzgewebe aus CVB3-infizierten (Coxsackievirus B3) LMP7<sup>-/-</sup> Mäusen (= i20S Proteasom defiziente Mäuse) eine erhöhte mRNA-Expression der Immununtereinheiten LMP2 und MECL-1 zeigt. Acht Tage nach der Infektion wurde allerdings auch hier nur die Inkorporation des Genproduktes LMP2 detektiert (Opitz et al., 2011). Das legt die Vermutung nahe, dass MECL-1 mit LMP7 kooperativ in den 20S *core* Komplex eingebaut wird. De et al. konnten den intermediären Komplextyp “LMP2- $\beta$ 2- $\beta$ 5 *core* Komplex“ auch in MECL-1<sup>-/-</sup> Mäusen nachweisen, was die kooperative Inkorporation von MECL-1 und LMP7 auch umgekehrt bestätigt (De et al., 2003).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine IFN $\gamma$  Stimulation zu der Expression und Inkorporation von Immununtereinheiten führt (Aki et al., 1994; Groettrup et al., 1996). Dies ermöglicht die Assemblierung der proteasomalen Isoform i20S (Krüger & Kloetzel, 2012). Die verschiedenen intermediären proteasomalen Subtypen können als weitere Isoformen, das „m20S Proteasom“, zusammengefasst werden. Sie werden symmetrisch oder asymmetrisch assembliert, ein Faktor der die Variabilität der proteasomalen Isoformen erhöht (Klare et al., 2007; Vigneron & van den Eynde, 2012).

Die inkorporierten Immununtereinheiten verschieben die Schnittpräferenzen des Immunproteasoms zu einer erhöhten chymotrypsin- und trypsinähnlichen Aktivität und einer verminderten caspaseähnlichen Aktivität (Dahlmann et al., 2000). Dies begünstigt den Schnitt hinter hydrophoben und basischen Aminosäuren, die im generierten Fragment den C-Terminus darstellen, welcher eine hohe Affinität zu MHC-I Molekülen aufweist (Kuckelkorn et al., 1995). Dies unterstreicht die proteasomale Relevanz in der Generierung von MHC-I kompatiblen Epitopen: diverse Studien konnten dem Immunproteasom eine verbesserte Epitopgenerierung und T-Zellaktivierung nachweisen; das Standardproteasom kann allerdings auch spezielle Epitope generieren (zusammengefasst in Sijts & Kloetzel, 2011).

#### **4.2. Die Assoziation zwischen dem 20S *core* Komplex und proteasomalen Regulatoren und Aktivatoren**

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass sowohl der c20S *core* Komplex als auch der i20S *core* Komplex mit dem 19S Regulator, dem PA28 $\alpha/\beta$  Aktivator und dem Monomer PA200 assoziieren (vgl. Abb. 3-3 bis 3-6). Die strukturb biologischen Analysen von Huber et al. stimmen damit gut überein. Sie schlussfolgerten, dass die Substitution der katalytisch aktiven  $\beta$ -Untereinheiten zu keiner Veränderung im proteasomalen  $\alpha$ -Ring führt, wodurch die Interaktion zu den Komplexpartnern auch nach einer IFN $\gamma$  Stimulation möglich ist (Huber et al., 2012).

Der Fokus dieser Studie lag auf der Analyse der proteasomalen Komplexe des Cytoplasmas, wodurch eine PA28 $\gamma$  Assoziation nicht näher betrachtet wurde, da diese Untereinheit vornehmlich im Zellkern lokalisiert (Rechsteiner & Hill, 2005).

Das Monomer PA200 konnte in *Mammalia*-Zellen noch keinem spezifischen Kompartiment zugeordnet werden. Die Funktion des PA200-Hybridproteasoms, in HeLa-Zellen lokalisiert es an künstlich induzierte Doppelstrangbrüche, macht eine Lokalisation von PA200 im Zellkern wahrscheinlich (Blickwedehl et al., 2008). In *S. cerevisiae* lokalisiert das homologe Protein Blm10 fast ausschließlich im Zellkern, das Kompartiment, in dem aber auch 80% der proteasomalen Komplexe lokalisieren (Russel et al., 1999). In humanen Zellen lokalisiert der Großteil der proteasomalen Komplexe im Cytoplasma, wie eine Analyse von zwei humanen Zelllinien ergab (Fabre et al., 2013). Eine Immunfluoreszenz in HeLa-Zellen sowie eine Fraktionierung in der humanen Monocyten-ähnlichen Zelllinie U937 konnten PA200 sowohl im Kern als auch im Cytoplasma detektieren, was eine cytoplasmatische Interaktion zwischen 20S Proteasom und PA200 ermöglicht (Ustrell et al., 2002; Fabre et al. 2013).

Vergleichende Studien von *Mammalia*-Gewebe konnten zeigen, dass PA200 in zwei Isoformen exprimiert wird. Die kürzere Isoform mit 160 kDa ist allerdings nur in murinem Gewebe detektierbar, und es ist fraglich, ob diese mit proteasomalen Komplexen assoziiert, da sie vermutlich auch mit nicht-proteasomalen Proteinen assoziiert (vgl. Abb. 3-7).

#### **4.2.1. Die proteasomalen Komplexpartner PA28 $\alpha/\beta$ und PA200 – eine antagonistische Assoziation**

In nicht IFN $\gamma$  stimulierten C4 Fibroblasten wird trotz der geringen Expression von PA28 $\beta$  der proteasomale Subtyp PA28 $\alpha/\beta$ -20S-PA28 $\alpha/\beta$  sowie 20S-PA200 assembliert, was der Western Blot der nativen PAGE sowie die zwei Varianten der nativen 2D PAGE (vgl. Abb. 3-3, 3-4, 3-7 und Abb. 3-8A mit 3-8B Zeitpunkt 0) bestätigen.

Im Verlauf einer IFN $\gamma$  Stimulation stellt die gesteigerte Detektion von LMP7 und die eintretende Detektion von MECL-1 die Neusynthese des i20S *core* Komplexes dar, welche

nach etwa zwei Stunden erfolgt (vgl. Abb. 3-8A). Interessanterweise zeigt dieses neusynthetisierte i20S Proteasom eine erhöhte Assoziation mit der Isoform PA200<sub>200kDa</sub>, während die Detektion des PA28 $\alpha/\beta$ -assoziiertem 20S Proteasoms parallel vermindert ist (vgl. Abb. 3-8B). Nach etwa 12 Stunden lässt sich wieder vermehrt PA28 $\alpha/\beta$  assoziiertes 20S Proteasom detektieren, eine Modulation die nach 24 Stunden mit der transienten Assoziation von i20S-PA28 $\alpha/\beta$  und PA28 $\alpha/\beta$ -i20S-PA28 $\alpha/\beta$  endgültig erreicht ist (vgl. Abb. 3-3 und 3-7).

In dieser Arbeit konnte so erstmals gezeigt werden, dass das PA200 Monomer durch eine IFN $\gamma$  Stimulation induziert wird und vermehrt an 20S/i20S *core* Komplexe assoziieren kann (vgl. Abb. 3-8). Eine PCR in C4 Fibroblasten zeigte des Weiteren, dass die Expression der PA200-kodierenden mRNA induziert werden kann. Ob es sich hierbei um eine IFN $\gamma$  oder Stressabhängige Induktion handelt ist jedoch noch unklar (persönliche Mitteilung von Dr. Ulrike Kuckelkorn).

Diese induzierte PA200-Assoziation verläuft wahrscheinlich antagonistisch zu der Assoziation mit dem PA28 $\alpha/\beta$  Aktivator. Die Deletion von PA28 $\alpha$  und PA28 $\beta$  in PA28<sup>-/-</sup> MEFs sowie die konstitutive hohe Expression von PA28 $\alpha$  und PA28 $\beta$  in Raw264.7 Makrophagen können ebenfalls bestätigen, dass die Assoziation von PA200 und PA28 $\alpha/\beta$  gegensätzlich verläuft: im Zellextrakt aus PA28<sup>-/-</sup> MEFs wird deutlich mehr PA200-assoziiertes 20S Proteasom detektiert als im Zellextrakt aus Raw264.7 Makrophagen (vgl. Abb. 3-7 B und C).

Diese antagonistische Assoziation von PA28 $\alpha/\beta$  und PA200 an das 20S Proteasom könnte zunächst mit einer PA200-Assoziation an neuassembliertes i20S Proteasom verlaufen. Nach einer zwölfstündigen IFN $\gamma$  Stimulation ist der PA28 $\alpha/\beta$  Aktivator induziert assembliert und könnte das assoziierte PA200 Monomer vom i20S Proteasom verdrängen (vgl. Abb. 3-8). Das Monomer PA200 besitzt nur einen C-Terminus, der mit dem  $\alpha$ -Ring interagieren kann. PA28 $\alpha/\beta$  weist dagegen eine stärkere Assoziation an den proteasomalen  $\alpha$ -Ring auf, da PA28 $\alpha/\beta$  sieben C-Termini besitzt, die mit den sieben  $\alpha$ -Untereinheiten des 20S *core* Komplexes interagieren können (Whitby et al., 2000; Stadtmueller & Hill, 2011).

Die physiologische Relevanz dieser Verdrängung könnte mit der Antigenpräsentation begründet werden, in dem das UPS, u.a. auch das PA28 $\alpha/\beta$  assoziierte Proteasom, beteiligt sein kann (Yewdell, Reits & Neefjes, 2003).

#### 4.2.2. Das Monomer PA200 - eine aktivierende Funktion?

Das 20S-PA200 Proteasom stellt eine kleine Subpopulation an proteasomalen Komplexen dar, dessen biologische Relevanz noch nicht ganz geklärt ist. Das Monomer PA200 wird in der Literatur allgemein als Aktivator bezeichnet, wobei in Hefestudien mit *S. cerevisiae* gezeigt wurde, dass Blm10 das 20S Proteasom nur bei einer einseitigen Assoziation aktiviert. Die Autoren argumentieren, dass Blm10 durch die Assoziation an einer Seite, die Öffnung der anderen, nicht assoziierten proteasomalen Pore induzieren kann. Bei einer beidseitigen Assoziation ist dies nicht möglich und der proteasomale Komplex ist inhibiert (Lehmann et al., 2008).

In der vorliegenden Arbeit wurden widersprüchliche Ergebnisse bezüglich der proteasomalen Aktivität bei einer PA200-Assoziation ermittelt: der Western Blot der nativen PAGE von dem Zellextrakt aus nicht IFN $\gamma$  stimulierten C4 zeigt den 20S-PA200 Komplex sowie den PA28 $\alpha/\beta$ -20S-PA28 $\alpha/\beta$  Komplex (vgl. Abb. 3-3). Für beide Komplexe konnte auch im fluorogenen Substratoverlay der nativen PAGE eine chymotryptische Aktivität gemessen werden (vgl. Abb. 3-2). In dem Lysat aus PA28 $^{-/-}$  MEFs wurde der PA200-20S Komplex detektiert (vgl. Abb. 3-3), der allerdings keine chymotryptische Aktivität aufweist (vgl. Abb. 3-2). Dieser Fakt wurde im fluorogenen Substratoverlay der nativen Gelelektrophorese für die vertikale native 2D PAGE bestätigt (vgl. Abb. 3-7), wodurch geschlussfolgert werden kann, dass die Assoziation des Monomers PA200 in PA28 $^{-/-}$  MEFs eindeutig keine chymotryptische Aktivität induziert. Das Proteasom scheint vielmehr inhibiert.

Ein Vergleich der drei unterschiedlichen proteasomalen Schnittpräferenzen in Hefezellen ließ den Schluss zu, dass die Assoziation von Blm10/PA200 hauptsächlich die katalytische Aktivität der Untereinheiten  $\beta 1$  und  $\beta 2$  aktiviert. Die chymotryptische Schnittpräferenz, welche von der Untereinheit  $\beta 5$  vermittelt wird, ist jedoch auch ohne Blm10/PA200-

Assoziation aktiv (Dange et al., 2011). Die Wahl des fluorogenen Substrates kann die widersprüchliche Beobachtung dieser Studie demnach nicht erklären.

Um die Frage der aktivierenden oder nicht aktivierenden Funktion des PA200 Monomers unabhängig von einer Zelllinie zu klären, müssten *in vitro* Studien mit einer Rekonstitution von aufgereinigtem PA200 und aufgereinigtem 20S Proteasom durchgeführt werden.

Die in der vorliegenden Studie detektierte Induktion der PA200-Assoziation an neuassembliertes i20S Proteasom kann funktionell nicht begründet werden (vgl. Abb. 3-8B). In Hefezellen konnte die Analyse der Biogenese des 20S Proteasoms eine Funktion des PA200-Homologs Blm10 detektieren (Fehlker et al., 2003; Marques et al., 2007). Es besteht die Möglichkeit, dass PA200 auch im *Mammalia*-System die 20S-Assemblierung unterstützen kann, die vorliegenden Ergebnisse können allerdings keinen Aufschluss darüber geben.

#### **4.2.3. Die Assemblierung des PA28 $\alpha$ / $\beta$ -Hybridproteasoms – Induktion durch das Cytokin IFN $\gamma$ und durch die Defizienz der Immununitäreinheit LMP7**

In IFN $\gamma$  stimulierten C4 Fibroblasten und unstimulierten Raw264.7 Makrophagen wurde eine vermehrte Ausbildung des PA28 $\alpha$ / $\beta$ -Hybridproteasoms detektiert (vgl. Abb. 3-5C und 3-6 und 3-7A und 3-7C). Diese Induktion des Hybridproteasoms wurde bereits in der Literatur beschrieben, dennoch konnte für diesen Komplexsubtyp keine spezifische, physiologische Funktion ermittelt werden. In der Degradationsanalyse der „*ornithin decarboxylase*“ (35S-ODC) wies das Hybridproteasom eine hohe Effizienz auf. Die Degradation dieses Proteins verläuft allerdings ohne eine Ubiquitinkonjugation (Hendil et al., 1998; Tanahashi et al., 2000).

Unstimulierte C4 Fibroblasten und PA28<sup>-/-</sup> MEFs zeigen trotz verminderter bzw. keiner PA28 $\alpha$ / $\beta$  Expression keine vermehrte Assemblierung des PA200-Hybridproteasoms. Sie assemblieren vornehmlich das 26S Proteasom (vgl. Abb. 3-7 A und B).

Die Assemblierung des PA28 $\alpha/\beta$ -Hybridproteasoms wird allerdings nicht nur durch den Stimulus des Cytokins IFN $\gamma$  induziert – sie kann auch durch eine Defizienz der Immunounereinheit LMP7 bewirkt werden. Eine Analyse des Milzgewebes einer LMP7<sup>-/-</sup> Maus ergab die deutliche Steigerung der Assemblierung des PA28 $\alpha/\beta$ -Hybridproteasoms, wenn im proteasomalen Kernkomplex die Untereinheit LMP7 fehlt (vgl. Abb. 3-21C und 3-22). In der horizontalen nativen 2D Analyse von Extrakten aus dem Milzgewebe einer C57Bl/6 Maus (WT) und einer LMP2<sup>-/-</sup> Maus lässt sich im Vergleich kaum PA28 $\beta$  detektieren (vgl. Abb. 3-22). Es kann angenommen werden, dass die induzierte Assemblierung zwischen PA28 $\alpha/\beta$  an 19S-20S (genauer m20S/c20S, da „LMP2 –  $\beta$ 2 –  $\beta$ 5 core Komplex“ oder „ $\beta$ 1–  $\beta$ 2 –  $\beta$ 5 core Komplex“) das Fehlen von LMP7 und MECL-1 kompensiert. Es ist bekannt, dass das aktive Zentrum von LMP7 leichter zugänglich ist als das aktive Zentrum von  $\beta$ 5. Dies kann mit der höheren Hydrophilität, dem erhöhten Binden des für die Hydrolyse essentiellen H<sub>2</sub>O-Moleküls, im aktiven Zentrums von LMP7 begründet werden. Des Weiteren ermöglicht die Orientierung der Aminosäure Met<sup>45</sup> das Binden von größeren Aminosäuren wie Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan (Huber et al., 2012). Die Deletion der Immunounereinheit bewirkt so vermutlich eine verminderte Substratzugänglichkeit am m20S/c20S Proteasom, die letztendlich in einer verminderten Degradation resultieren kann. Möglicherweise verändert die Assoziation eines PA28 $\alpha/\beta$  Aktivators die katalytische Kammer, um die Zugänglichkeit an die inkorporierten Immunounereinheiten LMP2 oder  $\beta$ 1, sowie  $\beta$ 2 und  $\beta$ 5 zu steigern, wozu bekannt ist, dass die Assoziation von PA28 $\alpha/\beta$  einen koordinierten Doppelschnitt durch die katalytischen Untereinheiten induziert (Dick et al., 1996).

De Graaf et al. konnten zeigen, dass LMP7<sup>-/-</sup>/MECL-1<sup>-/-</sup> Mäuse bei Infektionen mit verschiedenen Krankheitserregern (u.a. *Listeria monocytogenes* und Influenza Hkx31) eine reduzierte Epitopgenerierung im Vergleich zu infizierten PA28 $\alpha/\beta$ <sup>-/-</sup> Mäusen aufweisen (de Graaf et al., 2011). Die Autoren schlussfolgern, dass die IFN $\gamma$  induzierbaren Komponenten, die Immunounereinheiten und der PA28 $\alpha/\beta$  Aktivator, demnach additive Effekte auf die Epitopgenerierung besitzen. Die Assoziation des PA28 $\alpha/\beta$  Komplexes, als Kompensation der fehlenden relevanten Immunounereinheit LMP7, kann auf diese additive Effekte zurückgeführt werden.

Cascio et al. haben aufgereinigtes 26S Proteasom mit Hybridproteasom bezüglich der Effizienz in der Degradation von Proteinen wie Casein verglichen. Casein ist ein Protein, dass allerdings auch ohne Ubiquitinmarkierung proteasomal degradiert wird (Cascio et al., 2000; Peth et al., 2009). In dieser Analyse wurde kein Unterschied bezüglich der Degradationseffizienz des Caseins gemessen, aber die Peptidfragmente zeigten eindeutige Qualitätsunterschiede. Die PA28 $\alpha/\beta$  Assoziation nimmt somit Einfluss auf den generierten Fragmentpool, der sich von dem generierten Pool durch das 26S Proteasom unterscheidet. Die Länge der Peptidfragmente blieb allerdings unverändert. Es ist bekannt, dass PA28 $\alpha/\beta$  lediglich den N-terminalen Schnitt am Proteinfragment bewirkt. Das 20S Proteasom, v.a. die Immununtereinheit LMP7, vermittelt dagegen den C-terminalen Schnitt (Textoris-Taube et al., 2007).

Die Assoziation des Aktivators könnte demnach die Variabilität der Fragmente erhöhen und im Falle einer anschließenden Antigenpräsentation die Wahrscheinlichkeit der Antwort durch cytotoxische T-Lymphozyten modulieren (Cascio et al., 2002).

CVB3 infizierte LMP7<sup>-/-</sup> Mäuse (= i20S defiziente Mäuse) zeigen stärkere inflammatorische Läsionen im Gewebe des Herzmuskels und allgemein stärkere Krankheitssymptome als C57Bl/6-Wildtypiere. Die Defizienz des Immunoproteasoms wirkt sich allerdings nicht auf die MHC-I Antigenpräsentation aus, wie ein adoptiver T-Zelltransfer zeigen konnte. Die stärkere Ausprägung der Krankheitssymptome wurde mit der intrazellulären Anreicherung von polyubiquitinierten und oxidierten Proteinaggregaten begründet (Opitz et al., 2011). Das Hybridproteasom könnte so auch eine relevante Funktion im Abbau von poly-ubiquitinierten und oxidierten Proteinen besitzen. Vergleichende Degradationsstudien aus der vorliegenden Arbeit konnten zumindest eine erhöhte Degradationseffizienz des polyubiquitinierten Fusionsproteins durch das Hybridproteasom, im Vergleich zum 26S Proteasom, aufweisen (vgl. Abb. 3-11 und 3-15). Die schweren Krankheitssymptome der CVB3 infizierten LMP7<sup>-/-</sup> Mäuse zeigen aber, dass der Verlust der LMP7 Untereinheit auch durch eine Assoziation von PA28 $\alpha/\beta$  nicht komplett kompensiert werden kann.



### **4.3. 19S Regulator assoziierte proteasomale Komplexsubtypen zeigen funktionelle Unterschiede in der Degradation eines ubiquitinierten Fusionsproteins**

Fluorogene Substrate, die häufig zur Messung der proteasomalen Aktivität verwendet werden, können die proteasomale Pore sehr leicht passieren, da sie eine geringe Größe besitzen. Die Verwendung dieser Substrate kann so keine physiologische Aussage über den selektiven Substrateintritt und die damit verbundene Degradationseffizienz von ubiquitinierten Proteinen, die Hauptfunktion des Proteasoms, treffen. Ein Ziel der Arbeit war deshalb, eine Methode zu etablieren, welche die Messung der Degradation eines polyubiquitinierten Substrates ermöglicht (vgl. Kapitel 2.5.8). Als proteasomales Substrat wurde I $\kappa$ B $\alpha$  gewählt, da bekannt ist, dass dieser Inhibitor des NF $\kappa$ B-Signalwegs proteasomal abgebaut wird (Kanarek, London, Schueler-Furman & Ben-Neriah, 2010). Im Vergleich standen die verschiedenen proteasomalen Komplexsubtypen, die aus verschiedenen Zelllinien gewonnen wurden (vgl. Kap. 2.5.9. und Kap. 3.5.)

Die Ergebnisse der Komplexsubtyp-spezifischen Degradations- und Deubiquitinierungseffizienz aus Kapitel 3.5. werden in Abbildung 4-1 zusammengefasst dargestellt (vgl. Abb. 4-1).

Das 30S Proteasom zeigte im Vergleich zum 26S Proteasom eine erhöhte Deubiquitinierungseffizienz, was durch die beidseitige Assoziation des 19S Regulatorkomplexes erklärt werden kann (vgl. Abb. 3-13). Assemblieren zwei 19S Regulatorkomplexe an einem 20S *core* Komplex, assoziieren so auch die doppelte Menge an externen DUBs am 30S Proteasom. Dies kann die bessere Deubiquitinierungseffizienz des 30S Proteasoms, im Vergleich zu dem mit nur einem 19S Regulator assoziierten 26S Proteasom und Hybridproteasom, erklären.

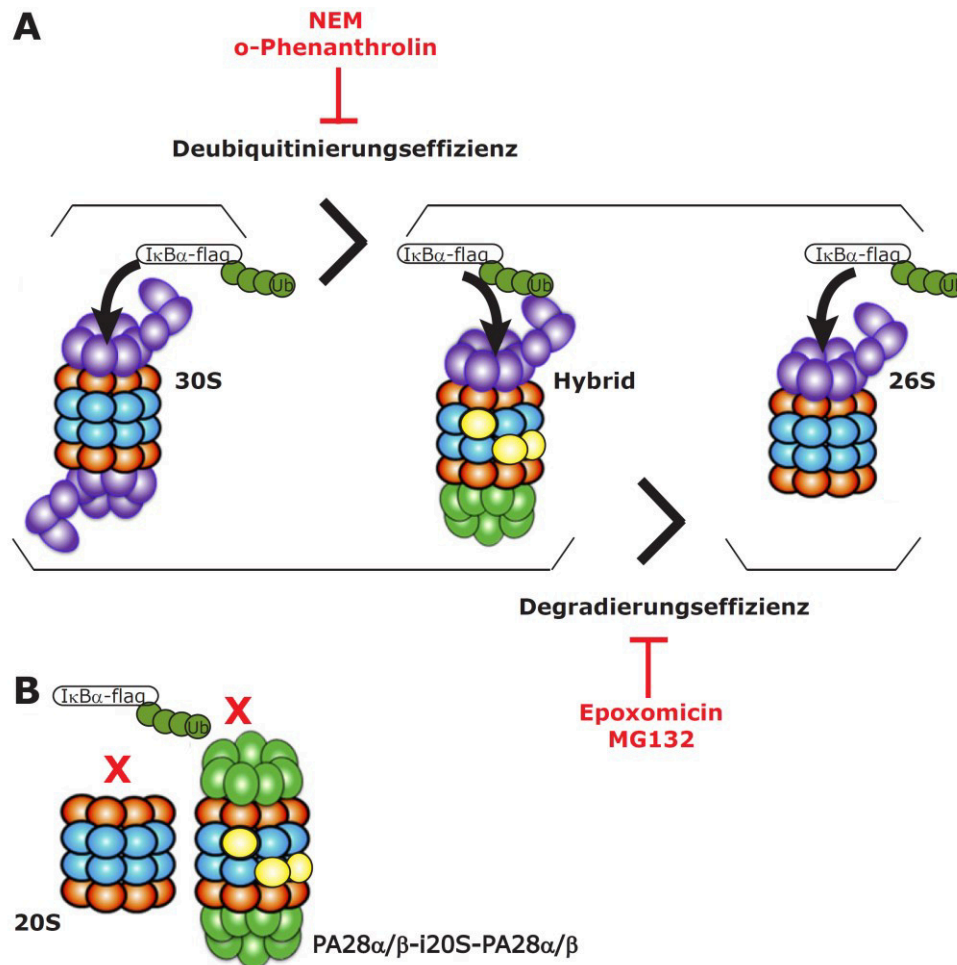


Abb. 4-1 Übersicht der Degradations- und Deubiquitinierungseffizienz von verschiedenen proteasomalen Komplexsubtypen. **A** Das 30S Proteasom besitzt eine bessere Deubiquitinierungseffizienz im Vergleich zum Hybridproteasom und 26S Proteasom. Bezogen auf die Degradation zeigen das 30S Proteasom und das Hybridproteasom eine höhere Effizienz als das 26S Proteasom. NEM und o-Phenanthrolin inhibieren die Deubiquitinierung; MG132 und Epoxomicin hemmen die Degradation des polyubiquitinierten Substrates flag-I $\kappa$ B $\alpha$ -Ubi-HA. **B** die proteasomalen Komplexe 20S und 20S-PA28 $\alpha$ / $\beta$  können das polyubiquitinierte Substrat nicht abbauen. 20S-PA200 verhält sich gleich, wurde aber nicht dargestellt. (Proteasomenabbildungen aus Wang et al., 2011)

Wenn das ubiquitinierte Substrat an beide 19S Regulatorkomplexe bindet, könnte geschlussfolgert werden, dass die Translokation des abzubauenen Substrates in die proteolytische Kammer möglicherweise bidirektional verläuft. Der 20S core Komplex ist symmetrisch aufgebaut und besitzt zwei  $\alpha$ -Ringe, die die Pore in das Innere öffnen, und zwei  $\beta$ -Ringe, die die katalytischen Untereinheiten assemblieren. Somit könnte die Eintrittspore gleichzeitig auch die Austrittspore sein, womit das polyubiquitinierte Substrat über beide Seiten in die katalytische Kammer translozieren könnte. Im Falle einer geöffneten Pore würde dies den Austritt des geschnittenen Fragmentes zusätzlich erhöhen. Beides wäre in Übereinstimmung mit der gesteigerten Degradationseffizienz des 30S Proteasoms im Vergleich zum einseitig assoziierten 26S Proteasom.

Der positive Effekt der geöffneten Austrittspore kann auch die bessere Degradationseffizienz des Hybridproteasoms erklären (vgl. Abb. 3-15). Da der PA28 $\alpha/\beta$  Aktivator das ubiquitinierte Substrat aber weder binden, noch deubiquitinieren und translozieren kann, kann das Substrat nur durch die Seite der 19S Regulator-Assoziation in die proteolytische Kammer eintreten. Eine bidirektionale Degradation ist somit nicht möglich, was so auch für das 26S Proteasom zutrifft.

Die hohe Degradationseffizienz des Hybridproteasoms lässt schlussfolgern, dass die inkorporierten Immununtereinheiten die Degradationsfähigkeit ebenfalls begünstigen, denn das Hybridproteasom beinhaltet den i20S *core* Komplex (vgl. Abb. 3-5). Seifert et al. konnten diese gesteigerte Degradationsfähigkeit der Immunvariante des „26S Proteasoms“ (i26S) experimentell zeigen (Seifert et al., 2010). Der positive Effekt der inkorporierten Immununtereinheiten erklärt auch die gesteigerte Degradationseffizienz des i30S Proteasoms (vgl. Abb. 3-15).

Allgemein bewirkt das Binden von ubiquitinierten Substraten eine allosterische Aktivierung des Proteasoms, was in einer gesteigerten Degradation resultiert. Diese Bindung initiiert die erweiterte Öffnung der proteasomalen Pore, wodurch die ubiquitinierten Substrate leichter abgebaut werden können (Bech-Otschir et al., 2009). Peth et al. konnten zeigen, dass die Bindung der Ubiquitinkette an die assoziierten DUBs Usp14/Ubp6 und UCH37 sowie eine entfaltete Domäne des abzubauenen Proteins die Aktivität der ATPasen steuert und somit die eigene Degradation initiiert (Peth et al., 2013). Die polyubiquitinierten Substrate können demnach ihre eigene Degradation begünstigen, die durch die einzelnen proteasomalen Komplexe unterschiedlich umgesetzt wird.

Liu et al. haben in einer Degradationsstudie zwei andere Substrate verwendet: tetraubiquitiniertes-Ubch10 und polyubiquitiniertes-CyclinB1. Als proteasomaler Subtyp wurde aufgereinigtes 26S Proteasom verwendet, welches noch zusätzlich mit freiem 19S Regulator inkubiert wurde, um die Assemblierung des „30S“ Komplexes zu induzieren. Dieser proteasomale Subtyp wurde allerdings immer noch „26S Proteasom“ genannt; eine Differenzierung in 26S und 30S Proteasom erfolgte nicht (Liu et al., 2006). Dennoch unterstreicht auch dieser Versuchsaufbau die bessere Degradationseffizienz des 30S

Proteasoms, welche in der Publikation von Liu et al. so allerdings nicht hervorgehoben wurde.

Abschließend muss erwähnt werden, dass das Verhältnis „Substrat zu proteasomaler Subtyp“ zwischen dem Ansatz mit 26S/Hybridproteasom und dem Ansatz mit 30S Proteasom verschieden ist. In der Zelle werden allgemein weniger 30S Proteasomsubtypen als 26S/Hybrid Proteasomsubtypen assoziiert, was auch in der Dichtegradientenzentrifugation der Zelllysate von C4 Fibroblasten (vgl. Abb. 3-1A) und PA28<sup>-/-</sup> MEFs (vgl. Abb. 3-10A) erkennbar ist. Das detektierte chymotryptische Aktivitätsmaximum wird durch das „26S/Hybridproteasom“ in den Fraktionen 16 bzw. 18 erreicht, wobei das fluorogene Substrat eine Aussage über die Quantität der proteasomalen Komplexe und nicht über ihre Effizienz trifft (vgl. Abb. 3-1A bzw. Abb. 3-10A). Da für den Degradationsansatz jeweils 10µl jeder ausgewählten Fraktion verwendet wurden, enthielt der Ansatz für die Messung der Degradationseffizienz des 26S/Hybridproteasoms eine höhere Proteasomkonzentration als der Messansatz für das 30S Proteasom. Da die verwendeten Konzentrationen allerdings das Verhältnis von 26S/Hybrid : 30S Proteasom in der Zelle repräsentieren, sollte sich dieser Fakt nicht auf die Aussage des Ergebnisses auswirken.

Die hier beschriebene Degradationskinetik des 30S Proteasoms ist mit drei bis sechs Stunden langsamer als die reale intrazelluläre Degradation. Die Zelle besitzt insgesamt  $8 \times 10^5$  Proteasomkomplexe, wobei jeder einzelne proteasomale Komplex 2,5 Substrate/min degradieren kann (Princiotta et al., 2003). Doch eine *in vitro* Methode kann nicht direkt mit einem intrazellulären Prozess verglichen werden. Die intrazelluläre Subkompartimentierung, die eine andere Substratkonzentration oder Lokalisierung bewirken kann, ist in dieser Methode beispielsweise ebenfalls nicht gegeben. Zwar können mittels Gradientenzentrifugation proteasomal assoziierte Proteine, die keine Komponenten des 19S Regulators, des 20S *core* Komplexes oder des PA28α/β Aktivators darstellen aber dennoch transient an den Komplex binden, mit aufgereinigt werden, doch es kann nicht ausgeschlossen werden, dass in diesem Versuchsaufbau weitere essentielle katalysierende Faktoren nötig sind, die positiv auf die proteasomale Degradation

einwirken. Das würde die gemessene langsame Degradationskinetik von minimal drei Stunden erklären (vgl. Abb. 3-11).

Des Weiteren muss berücksichtigt werden, dass die Auftrennung der proteasomalen Komplexe in einer Glycerolhaltigen Gradientenlösung erfolgte, wodurch die ausgewählten Fraktionen, gerade für das 30S Proteasom, einen Glycerolgehalt von etwa 35% aufwies. Diese Menge wurde durch die Zugabe des Substratpuffers mit 10% Glycerol zwar noch verdünnt, dennoch kann Glycerol die Degradationskinetik durch seine hohe Viskosität vermindern.

#### **4.4. Eine mögliche Assoziation zwischen dem Chaperonin TriC und dem Proteasom in lymphoiden Zellen**

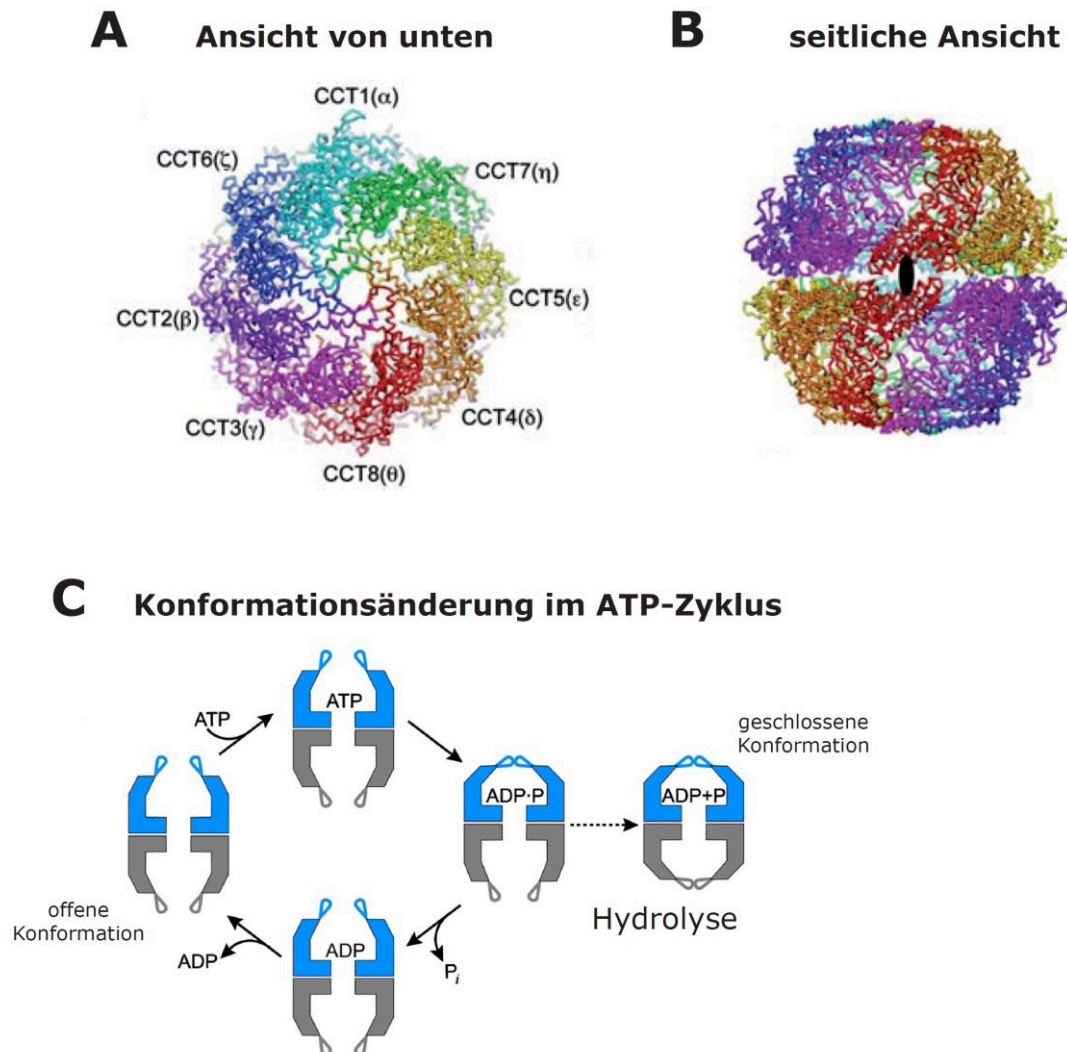
Die in dieser Arbeit analysierten unbekannten, sehr hochmolekularen Komplexe zeigen in der nativen Gelelektrophorese eine chymotryptische Aktivität und wurden vermehrt in Raw264.7 Makrophagen nachgewiesen. In anderen Zellen, wie C4 oder embryonalen PA28<sup>-/-</sup> Fibroblasten wurde dieser Komplexotyp ebenfalls detektiert, jedoch in deutlich geringerem Maße (vgl. Abb. 3-24). Rein rechnerisch müsste die molekulare Masse dieses Komplexes mindestens 2,4 MDa umfassen, wobei es sich auch um ein weitaus höheres Molekulargewicht handeln kann. Die vertikale native 2D PAGE und die Massenspektrometrie bestätigen proteasomale Untereinheiten sowie das Chaperonin TriC/CCT, diverse Hitzeschockproteine, ribosomale Untereinheiten, Translationsinitiationsfaktoren und t-RNA-Ligasen als Komponenten dieses unbekannten, sehr hochmolekularen Komplexes (vgl. Abb. 3-25 sowie Tab. 3-1 und 3-2). Gerade die Detektion von Komponenten der Proteinbiosynthese macht eine Beteiligung des Proteasoms im Proteinaufbau, der sogenannten kotranslationalen proteasomalen Degradation, möglich.

Als Beispiel dieser kotranslationalen Degradation dient das Genprodukt NFκB1, dessen mRNA sowohl für die Proteinsynthese von p50 als auch von p105 fungiert. Während der Proteasom-vermittelten kotranslationalen Prozessierung der naszierenden Polypeptidkette wird das Genprodukt p50 generiert; die Generation von p105 erfolgt

durch eine Blockierung des Proteasoms, die durch eine Faltung des C-Terminus der naszierenden Polypeptidkette induziert wird (Lin et al., 1998). Dieser kotranslationale Abbau erfordert einen Komplex aus mRNA, die gleichzeitig von mehreren Ribosomen abgelesen wird (Polysom). T-RNA-Ligasen stellen dabei die benötigten Aminosäuren bereit und die naszierende Polypeptidkette kann durch assoziierte Proteasomkomplexe parallel degradiert werden. Duttler et al. konnten in einem Saccharosegradienten eine Komigration von Proteasomkomplexen mit translatierenden Ribosomen entdecken, die durch EDTA aufgelöst wurde; das Molekül EDTA bewirkt dabei eine Polysomendissoziation (Duttler et al., 2013). Ihre Hefestudien zeigten des Weiteren, dass ein Anteil von 1% - 5% aller naszierenden Polypeptidketten kotranslational ubiquitiniert wird und somit für die proteasomale Degradation zugänglich ist. Eine erfolgreiche Proteinfaltung, die durch ribosomal assoziierte Chaperone umgesetzt wird, macht eine kotranslationale Degradation von fehlerhaft synthetisierten Proteinen unnötig (Duttler et al., 2013).

Sha et al. bezeichnen einen Komplex aus ribosomalen Proteinen, dem 43S Initiationskomplex, diversen Elongationsfaktoren, t-RNA-Synthetasen, mehreren Untereinheiten des 20S Proteasoms und des 19S Regulators sowie aus Hsp70 und Komponenten des TriC/CCT-Komplexes als sogenanntes „*translasome*“. Die aufgezählten Komponenten konnten in *S. pombe* mit dem eukaryotischen Initiationsfaktors eIF3 kopräzipitiert werden, der in der Proteinbiosynthese mehrere essentielle Funktionen erfüllt (Sha et al., 2009).

Eine mögliche Assoziation mit dem Chaperonin TriC/CCT (vgl. Abb. 4.2.) konnte auch in dieser Studie durch massenspektrometrische Analysen detektiert werden (vgl. Tab. 3-2 und 3-3 sowie Anhang 1 und 2). Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen ließen eine mögliche proteasomale Assoziation erkennen, wobei eine Differenzierung zwischen einer Assoziation des 19S Regulators und des Chaperonins TriC schwierig war, da beide Komplexe im *negative stain* eine ähnliche Struktur zeigen (vgl. Abb. 3-27). Die vom ATP-Zyklus abhängigen Konformationen von TriC erschweren die Analyse zunehmend, da unklar ist, in welcher Konformation TriC am 20S *core* Komplexe binden könnte.



**Abb. 4-2 Das Chaperonin TriC.** **A** Die Ansicht von unten zeigt einen oktameren Ring aus den einzelnen Untereinheiten **B** Die seitliche Ansicht zeigt zwei assoziierte oktamere Ringe.

Der Proteinkomplex *Tcp-1 ring complex* (TriC) oder *chaperonin containing T-complex* (CCT) ist ein Chaperonin der Gruppe II (Kabir et al., 2011). Chaperonine bestehen aus zwei oktameren Ringen, die je acht verschiedene Untereinheiten tragen. Einzelne Untereinheiten sind zu 30% identisch, was die Domänen der ATP bindenden und hydrolysierenden Kasette, sowie die hydrophobe Substratbindetasche umfasst. Diese lokalisiert im Inneren des Chaperonins und bindet die hydrophoben Seitenketten der zu faltenden Proteine. Durch die Energiefreisetzung der ATP-Hydrolyse kann das Protein in seine korrekte Form gefaltet und entlassen werden. Insgesamt werden 5-10% aller neusynthetisierten Proteine mittels TriC in ihre richtige Konformation gebracht.

**C** Im ATP und ADP gebundenen Zustand ist das Chaperonin geöffnet. Während der ATP-Hydrolyse entsteht ADP und  $P_i$  und es kann eine geschlossene Konformation von TriC detektiert werden, die der Proteinfaltung dient (modifiziert nach Cong et al., 2010; Cong et al., 2012).

Das Chaperonin interagiert auch mit den Hitzeschockproteinen Hsp70 und Hsp90, die einen Teil der neusynthetisierten Proteine binden und an TriC weitergeben, um die finale Faltung des neusynthetisierten Proteins zu ermöglichen (Kabir et al., 2011). Dieser Fakt



könnte die massenspektrometrische Detektion von Hsp70 und Hsp90 $\alpha/\beta$  erklären (vgl. Tab. 3-2 und 3-3).

Der Proteinkomplex TriC wurde als Faktor der MHC-I Präsentation ermittelt, da dieser Komplex Peptide aufnimmt, vor N-terminalem Abbau im Cytoplasma schützt und die Fragmente in das ER transportiert. Diese Funktion wird durch die Chaperone Hsp70 und Hsp90 unterstützt (Kunisawa et al., 2003). Diese Rolle von TriC könnte die Existenz eines möglichen 19S-20S-TriC-Komplexes erklären (vgl. Abb. 3-27 gelb). Das 20S Proteasom bindet an den 19S Regulator um den Abbau eines ubiquitinierten Substrates zu ermöglichen. Die restringierten Fragmente könnten anschließend nicht ins Cytosol entlassen werden, sondern direkt ins Innere des Chaperonins TriC aufgenommen werden. Eine direkte Weitergabe an den TAP-Transporter könnte das Fragment vor einer weiteren Degradation durch cytosolische Aminopeptidasen schützen (Kunisawa et al., 2003).

Es kann vermutet werden, dass das 20S Proteasom und das Chaperonin TriC auch zu einem TriC-20S-TriC Komplex assoziieren (vgl. Abb. 3-27 rot), wobei in diesem Fall der Mechanismus der Substratselektion fraglich ist. Substrate könnten naszierende Proteine sein, die auch durch das Chaperonin TriC nicht ausreichend gefaltet wurden und somit sofort dem proteasomalen Abbau zugeführt werden. Dabei muss allerdings berücksichtigt werden, dass das abzubauen Protein in entfalteter Konformation durch die proteasomale Pore translozieren muss. Der  $\alpha$ -Ring liegt geschlossen vor und kann erst durch das Andocken spezifischer C-Termini des Komplexpartners in die Bindetaschen aus jeweils zwei  $\alpha$ -Untereinheiten die Öffnung der proteasomalen Pore bewirken (vgl. Kapitel 1.4) (Stadtmueller & Hill, 2011). TriC müsste im Falle einer beidseitigen Assoziation an das 20S Proteasom die Öffnung steuern können.

Im Falle der Raw264.7 Zellen könnte sich die mögliche TriC-Assoziation auf die natürliche Phagozytenfunktion von Makrophagen zurückführen lassen. Während des lysosomalen Abbaus (Autophagie) werden proteinmodifizierende Moleküle wie H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> freigesetzt, die auch im Cytoplasma zu einer erhöhten Oxidierung führen. Diese oxidierten Proteine werden ubiquitiniert und über das Proteasom abgebaut (Seifert et al., 2010; Ebstein et al., 2013). Dieser Prozess könnte durch eine vorherige Entfaltung durch



das Chaperonin TriC gefördert werden. Des Weiteren bewirkt oxidativer Stress eine erhöhte Fehlerrate naszierender Polypeptidketten, was wiederum zu einer erhöhten kotranslationalen Proteindegradation führen kann (Yewdell & Princiotta 2012). Dies könnte auch die im Vergleich zu den nicht-lymphatischen Zellen erhöhte Detektion des proteasomal assoziierten Polysoms in Raw264.7 Makrophagen erklären.

#### **4.5. Die hochvariable Proteasompopulation – eine Notwendigkeit für die proteolytische Plastizität**

Neben der Analyse der vier murinen Zelllinien (C4 Fibroblasten, Raw264.7 Makrophagen, PA28<sup>-/-</sup> MEFs und HL-1 Kardiomyozyten) konnte auch die Analyse des Herz- und Milzgewebes der Mäuse der drei Stämme die Diversität der intrazellulären Proteasompopulation zeigen. Im Herz- und Milzgewebe aus Wildtypmäusen des Stammes C57Bl/6 lassen sich jeweils beispielsweise PA28 $\alpha/\beta$ -assoziiertes 20S Proteasom, 26S Proteasom und eine geringe Menge an Hybridproteasom nachweisen. Das 30S Proteasom lässt sich im Herzgewebe deutlich, im Milzgewebe jedoch kaum, detektieren (vgl. Abb. 3-19, 3-22, 3-23).

Das 30S Proteasom wurde in den hier getesteten Zelllinien allgemein eher geringfügig nachgewiesen, da auch nicht IFN $\gamma$  stimulierte bzw. IFN $\gamma$  stimulierte C4 Fibroblasten eindeutig mehr 26S Proteasom bzw. Hybridproteasom als 30S bzw. i30S Proteasom aufwiesen (vgl. Abb. 3-5). Diese geringe Assemblierungsrate ist auffällig, da das 30S Proteasom durch seine beidseitige Assoziation mit dem 19S Regulator tendenziell die bessere Deubiquitinierungs- und Degradationseffizienz als das 26S Proteasom aufweist (vgl. Abb. 3-11 und Abb. 4-1).

Die geringe Assemblierung von 30S Komplexen kann durch die hohe Degradationseffizienz des Hybridproteasoms ausgeglichen werden (vgl. Abb. 3-11 und 3-15). Es ist zu vermuten, dass das dauerhaft assemblierte Hybridproteasom in lymphatischen Zellen, wie z.B. den Raw264.7 Makrophagen, polyubiquitinierte Substrate ebenso gut abbauen kann wie das 30S Proteasom. Dieser Komplexsubtyp muss deshalb in Zellen nicht-lymphatischen Ursprungs vermehrt assembliert werden, da in Lysat aus

Raw264.7 Makrophagen und dem analysierten Milzgewebe verhältnismäßig wenig 30S Proteasom detektiert wurde.

Die Rolle des 26S Proteasoms, welches eine geringere Degradationseffizienz aufweist (vgl. Abb. 3-11), könnte mit der spontanen Assoziationsmöglichkeit zwischen 26S Proteasom und freiem 19S Regulator zu neuen 30S Komplexen bzw. zwischen 26S Proteasom und dem PA28 $\alpha/\beta$  Aktivator zu neuen Hybridproteasomen begründet werden. Dies könnte Schwankungen in der anfallenden, abzubauenen Proteinlast ausgleichen und eine schnelle Adaption an eine Infektion ermöglichen. Zwar besitzt der 20S *core* Komplex im Hybridproteasom vermutlich mehrheitlich inkorporierte Immununtereinheiten, aber dieses Immunoproteasom muss erst assembliert werden. Eine schnelle, spontane Assoziation zwischen 26S Proteasom und bereits assemblierten, frei vorliegendem PA28 $\alpha/\beta$  Aktivator könnte zur Überbrückung assembliert werden und schon vorzeitig ubiquitinierte Proteine effizient abbauen.

Wie bereits geschildert wurde benötigt die Zelle in einer intrazellulären Stresssituation vielfältig agierende Komponenten, um den Umfang der erfordernten Funktionen zu leisten. Das Proteasom spielt dabei eine essentielle Rolle: es baut kurzlebige, regulatorische sowie nicht mehr benötigte Proteine ab und es eliminiert oxidierte und ubiquitinierte Proteinaggregate, die den reibungslosen Ablauf aller zellulären Prozesse negativ beeinflussen. Des Weiteren können beispielsweise virale Proteine abgebaut werden, deren Fragmente sofort als Epitop weiterverarbeitet werden können (Yewdell, Reits & Neefjes, 2003). So weist nur eine diverse Proteasompopulation die hohe proteolytische Plastizität auf, die die vielfältigen Anforderungen der Zelle erfüllen kann.

## Literaturverzeichnis

- Ahn K, Erlander M, Leturcq M, Peterson PA, Früh K and Yang Y, 1996.  
*In Vivo Characterization of the Proteasome Regulator PA28*. JBC, Vol. 271, No. 30
- Aki N, Shimbara N, Takashina M, Akiyama K, Kagawa S, Tamura T, Tanahashi N, Yoshimura T, Tanaka K, Ichihara A, 1994.  
*Interferon-  $\gamma$  Induces Different Subunit Organizations and Functional Diversity of Proteasomes*. J. Biochem., Vol 115
- Bar-Nun S, Glickman MH, 2011.  
*Proteasomal AAA-ATPases: Structure and Function*. BBA, Vol. 1823
- Bech-Otschir D, Helfrich A, Enenkel C, Consiglieri G, Seeger M, Holzhütter HG, Dahlmann D, Kloetzel PM, 2009.  
*Polyubiquitin substrates allosterically activate their own degradation by the 26S proteasome*. NATURE structural and molecular biology, Vol. 16, No. 2
- Beck P, Dubiella C, Groll M, 2012.  
*Covalent and non-covalent reversible proteasome Inhibition*. Biol. Chem., Vol. 393, No. 10
- Besche HC, Haas W, Gygi SP, Goldberg AL, 2009.  
*Isolation of Mammalian 26S Proteasomes and p97/VCP Complexes Using the Ubiquitin-like Domain from HHR23B Reveals Novel Proteasome-Associated Proteins*. Biochemistry, Vol. 48
- Blickwedehl J, Agarwal M, Seong C, Pandita RK, Melendy T, Patrick Sung P, Pandita TK, Bangia N, 2008.  
*Role for proteasome activator PA200 and postglutamyl proteasome activity in genomic stability*. PNAS, Vol. 105, No. 42
- Borissenko L, Groll M, 2007.  
*Diversity of proteasomal missions: fine tuning of the immune response*. Biol. Chem., Vol. 388
- Braun BC, Glickman M, Kraft R, Dahlmann B, Kloetzel PM, Finley D, Schmidt M, 1999.  
*The base of the proteasome regulatory particle exhibits chaperone-like activity*. NATURE Cell Biology, Vol. 1
- Cascio P, Call M, Petre BM, Walz T, Goldberg AL, 2002.  
*Properties of the hybrid form of the 26S proteasome containing both 19S and PA28 complexes*. The EMBO Journal, Vol. 21, No. 11
- Ciechanover A, 2005a.  
*Intracellular protein degradation: from a vague idea thru the lysosome and the ubiquitin-proteasome system and onto human diseases and drug targeting*. Cell Death and Differentiation, Vol. 12
- Ciechanover A, 2005b.  
*Proteolysis: from the lysosome to ubiquitin and the proteasome*. NATURE REVIEW molecular cell biology, Vol. 6

Claycomb W, Lanson NR, Stallworth BS, Egeland DB, Delcarpio JB, Bahinski A, Izzo NJ, 1998.

*HL-1 cells: A cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 95

Cong Y, Baker ML, Jakana J, Woolford D, Miller EJ, Reissmann S, Kumar RN, Redding-Johanson AM, Batth TS, Mukhopadhyay A, Ludtke SJ, Frydman J, Chiu W, 2010.

*4.0-Å resolution cryo-EM structure of the mammalian chaperonin TRiC/CCT reveals its unique subunit arrangement.* PNAS, Vol. 107, No. 11

Cong Y, Schröder GF, Meyer AS, Jakana J, Ma B, Dougherty MT, Schmid MF, Reissmann S, Levitt M, Ludtke SL, Frydman J, Wa C, 2012.

*Symmetry-free cryo-EM structures of the chaperonin TRiC along its ATPase-driven conformational cycle.* The EMBO Journal, Vol. 31

Dahlmann B, Ruppert T, Kuehn L, Merforth S, Kloetzel PM, 2000.

*Different Proteasome Subtypes in a Single Tissue Exhibit Different Enzymatic Properties.* J. Mol. Biol., Vol. 303

Dange T, Smith D, Noy T, Rommel PC, Jurzitza L, Cordero RJB, Legendre A, Finley D, Goldberg AL, Schmidt M, 2011.

*Blm10 Protein Promotes Proteasomal Substrate Turnover by an Active Gating Mechanism.* JBC, Vol. 286, No. 50

De M, Jayarapu K, Elenich L, Monaco JJ, Colbert RA, Griffin TA, 2003.

*β2 Subunit Propeptides Influence Cooperative Proteasome Assembly.* JBC, Vol. 278, No. 8

de Graaf N, van Helden MJG, Textoris-Taube K, Chiba T, Topham DJ, Kloetzel PM, Zaiss DMW, Sijts AJAM, 2011.

*PA28 and the proteasome immunosubunits play a central and independent role in the production of MHC class I-binding peptides in vivo.* Eur J Immunol., Vol. 41, No. 4

Dick T, Ruppert T, Groettrup M, Kloetzel PM, Kuehn L, Koszinowski UH, Stevanovic S, Schild H, Rammensee HG, 1996.

*Coordinated Dual Cleavages Induced by the Proteasome Regulator PA28 Lead to Dominant MHC-I Ligands.* CELL, Vol., 86

Dolan BP, Bennink JR, Yewdell JW, 2011.

*Translating DRiPs: progress in understanding viral and cellular sources of MHC class I peptide ligands.* Cell Mol Life Sci, Vol. 68, No. 9

Dubiel W, Pratt G, Ferrell K, Rechsteiner M, 1992.

*Purification of an 11 S Regulator of the Multicatalytic Protease.* JBC, Vol. 267, No. 31

Duttler S, Pechmann S, Frydman J, 2013.

*Principles of Cotranslational Ubiquitination and Quality Control at the Ribosome.* Molecular Cell, Vol. 50

Ebstein F, Voigt A, Lange N, Warnatsch A, Schröter F, Prozorovski T, Kuckelkorn U, Aktas O, Seifert U, Kloetzel PM, Krüger E, 2013.

*Immunoproteasomes Are Important for Proteostasis in Immune Responses.* CELL, Vol. 152

- Fabre B, Lambour T, Delobel J, Amalric F, Monsarrat B, Burlet-Schiltz O, Bousquet-Dubouch MP, 2013.  
*Subcellular Distribution and Dynamics of Active Proteasome Complexes Unraveled by a Workflow Combining in Vivo Complex Cross-Linking and Quantitative Proteomics*. Molecular & Cellular Proteomics, Vol. 12.3
- Fehlker, Wendler P, Lehmann A, Enenkel C, 2003.  
*Blm3 is part of nascent proteasomes and is involved in a late stage of nuclear proteasome assembly*. EMBO, Vol. 4, No. 10
- Goldberg, AL, 2007.  
*Functions of the proteasome: from protein degradation and immune surveillance to cancer therapy*. Biochemical Society Transactions, Vol. 35, No. 1
- Groettrup M, Kraft R, Kostka S, Standera S, Stohwasser R, Kloetzel PM, 1996.  
*A third IFN $\gamma$  inducible subunit exchange in the 20S proteasome*. Eur. J. Immunol., Vol. 26, No. 4
- Groll M, Clausen T, 2003.  
*Molecular shredders: how proteasomes fulfill their role*. Current Opinion in Structural Biology, Vol. 13
- Guillaume B, Chapiro J, Stroobant V, Colau D, Van Holle B, Parvizi G, Bousquet-Dubouch MP, Théate I, Parmentier N, van den Eynde BJ, 2010.  
*Two abundant proteasome subtypes that uniquely process some antigens presented by HLA class I molecules*. PNAS, Vol. 107, No. 43
- Heink S, Ludwig D, Kloetzel PM, Krüger E, 2005.  
*IFN $\gamma$ -induced immune adaptation of the proteasome system is an accelerated and transient response*. PNAS, Vol. 102, No. 26
- Hendil KB, Khan S, Tanaka K, 1998.  
*Simultaneous binding of PA28 and PA700 activators to 20 S proteasomes*. Biochem. J., Vol. 3320
- Hoffman L, Pratt G, Rechsteiner M, 1992.  
*Multiple Forms of the 20 S Multicatalytic and the 26 S Ubiquitin/ATPdependent Proteases from Rabbit Reticulocyte Lysate*. JBC, Vol. 267, No. 31
- Huber EM, Basler M, Schwab R, Heinemeyer W, Kirk CJ, Groettrup M, Groll M, 2012.  
*Immuno- and Constitutive Proteasome Crystal Structures Reveal Differences in Substrate and Inhibitor Specificity*. Cell, Vol. 148
- Husnjak K, Elsasser S, Zhang N, Chen X, Randles L, Shi Y, Hofmann K, Walters K, Finley D, Dikic I, 2008.  
*Proteasome subunit Rpn13 is a novel ubiquitin receptor*. NATURE, Vol. 453, No. 7194
- Iwanczyk J, Sadre-Bazzaz K, Ferrell K, Kondrashkina E, Formosa T, Hill CP, Ortega J, 2006.  
*Structure of the Blm10-20S Proteasome Complex by Cryoelectron Microscopy. Insights into the Mechanism of Activation of Mature Yeast Proteasomes*. J Mol Biol., Vol. 363, No. 3
- Jäkel S, 2009.  
*Die Rolle von Proteasomen in der Antigenpräsentation in der Coxsackievirus B3 induzierten akuten und chronischen Myokarditis*.

- Kabir MA, Uddin W, Narayanan A, Reddy PK, Jairajpuri MA, Sherman F, Ahmad Z, 2011.  
*Functional Subunits of Eukaryotic Chaperonin CCT/TRiC in Protein Folding.*  
Journal of Amino Acids, Vol. 2011
- Kanarek N, London N, Schueler-Furman O, Ben-Neriah Y, 2010.  
*Ubiquitination and Degradation of the Inhibitors of NF- $\kappa$ B.* CSH Perspectives in  
Biology
- Kastner B, Fischer N, Golas MM, Sander B, Dube P, Boehringer D, Hartmuth K, Deckert J,  
Hauer F, Wolf E, Uchtenhagen H, Urlaub H, Herzog F, Peters JM, Poerschke D,  
Lührmann R, Stark H, 2008.  
*GraFix: sample preparation for single particle electron cryomicroscopy.* NATURE  
methods, Vol. 5, No. 1
- Kisselev A, Kaganovich D, Goldberg AL, 2002.  
*Binding of Hydrophobic Peptides to Several Non-catalytic Sites Promotes Peptide  
Hydrolysis by All Active Sites of 20 S Proteasomes.* JBC, Vol. 277, No. 25
- Klare N, Seeger M, Janek K, Jungblut PR, Dahlmann B, 2007.  
*Intermediate-type 20 S Proteasomes in HeLa Cells: "Asymmetric" Subunit  
Composition, Diversity and Adaptation.* J. Mol. Biol., Vol. 373
- Kloetzel PM, 2001.  
*Antigen processing by the proteasome.* NATURE Review Molecular Cell Biology  
Vol. 2
- Kloetzel PM, 2004.  
*Generation of major histocompatibility complex class I antigens: functional interplay  
between proteasomes and TPPII.* NATURE Review Immunology, Vol. 5, No. 7
- Knowlton JR, Johnston SC, Whitby FG, Realini C, Zhang Z, Rechsteiner M, Hill CP, 1997.  
*Structure of the proteasome activator REG $\alpha$  (PA28 $\alpha$ ).* NATURE, Vol. 390
- Komander D, 2009.  
*The emerging complexity of protein ubiquitination.* Biochem. Soc. Trans., Vol. 37
- Kopp F, Dahlmann B, Kuehn L, 2001.  
*Reconstitution of Hybrid Proteasomes from Purified PA700-20 S Complexes and  
PA28ab Activator: Ultrastructure and Peptidase Activities.* J. Mol. Biol., Vol. 313
- Kravtsova-Ivantsiv Y, Sommer T, Ciechanover A, 2012.  
*The Lysine48-Based Polyubiquitin Chain Proteasomal Signal: Not a Single Child  
Anymore.* Angew. Chem. Int. Ed., Vol. 51
- Kriegenburg F, Poulsen EG, Koch A, Krüger E, Hartmann-Petersen R, 2011.  
*Redox Control of the Ubiquitin-Proteasome System: From Molecular Mechanisms  
to Functional Significance.* Antioxidants and Redox Signalling, Vol. 15, No. 8
- Krüger E, Kloetzel PM, 2012.  
*Immunoproteasomes at the interface of innate and adaptive immune responses:  
two faces of one enzyme.* Current Opinion in Immunology, Vol. 24
- Kuckelkorn U, Frentzel S, Kraft R, Kostka S, Groettrup M, Kloetzel PM, 1995.  
*Incorporation of major histocompatibility complex - encoded subunits LMP2 and  
LMP7 changes the quality of the 20s proteasome polypeptide processing products  
independent of interferon- $\gamma$ .* Eur. J. Immunol., Vol. 25

- Kumar B, Kim YC, DeMartino GN, 2010.  
*The C Terminus of Rpt3, an ATPase Subunit of PA700 (19 S) Regulatory Complex, Is Essential for 26 S Proteasome Assembly but Not for Activation.* JBC, Vol. 285, No. 50
- Kunisawa J, Shastri N, 2008.  
*The Group II Chaperonin TRiC Protects Proteolytic Intermediates from Degradation in the MHC Class I Antigen Processing Pathway.* Mol. Cell, Vol. 12
- Lam YA, Lawson TG, Velayutham M, Zweier JL, CM Pickart, 2002.  
*A proteasomal ATPase subunit recognizes the polyubiquitin degradation signal.* NATURE, Vol. 416
- Lander GC, Estrin E, Matyskiela ME, Bashore C, Nogales E, Martin A, 2012.  
*Complete subunit architecture of the proteasome regulatory particle.* NATURE Vol. 482, No. 7384
- Lasker K, Förster F, Bohn S, Walzthoeni T, Villa E, Unverdorben P, Beck F, Aebersold R, Sali A, Baumeister W, 2012.  
*Molecular architecture of the 26S proteasome holocomplex determined by an integrative approach.* PNAS, Vol. 109, No. 5
- Lehmann A, Jechow K, Enenkel C, 2008.  
*Blm10 binds to pre-activated proteasome core particles with open gate conformation.* EMBO Rep., Vol. 9, No. 12
- Leitner A, Joachimiak LA, Bracher A, Mönkemeyer L, Walzthoeni T, Chen B, Pechmann S, Holmes S, Cong Y, Ma B, Ludtke S, Chiu W, Hartl U, Aebersold R, Frydman J, 2012.  
*Molecular Architecture of the Eukaryotic Chaperonin TRiC/CCT.* Cell Structure, Vol. 20
- Li X, DeMartino GN, 2009.  
*Variably modulated gating of the 26S proteasome by ATP and Ubiquitin.* Biochem J., Vol. 421, No. 3
- Lin L, deMartino GN, Greene WC, 1998.  
*Cotranslational biogenesis of NF-kappaB p50 by the 26S proteasome.* CELL, Vol. 92
- Liu C, Li X, Thompson D, Wooding K, Chang T, Tang Z, Yu H, Thomas PJ, DeMartino GN, 2006.  
*ATP Binding and ATP Hydrolysis Play Distinct Roles in the Function of 26S Proteasome.* Mol. Cell, Vol. 24
- Liu C, Jacobsen AD, 2012.  
*Functions of the 19S complex in proteasomal degradation.* Trends in Biochemical Science, Vol. 38, No. 2
- Marques AJ, Glanemann C, Ramos PC, Dohmen RJ, 2007.  
*The C-terminal Extension of the  $\beta 7$  Subunit and Activator Complexes Stabilize Nascent 20 S Proteasomes and Promote Their Maturation.* JBC, Vol. 282, No. 48
- Murata S, Sasaki K, Kishimoto T, Niwa S, Hayashi H, Takahama Y, Tanaka K, 2007.  
*Regulation of CD8+ T Cell Development by Thymus-Specific Proteasomes.* SCIENCE, Vol. 316
- Murata S, Yashiroda H Tanaka K, 2009.  
*Molecular mechanisms of proteasome assembly.* NATURE Reviews, Vol. 20



- Opitz E, Koch A, Klingel K, Schmidt F, Prokop S, Rahnefeld A, Sauter M, Heppner FL, Völker U, Kandolf R, Kuckelkorn U, Stangl K, Krüger E, Kloetzel PM, Voigt A, 2011.  
*Impairment of Immunoproteasome Function by  $\beta 5i$ /LMP7 Subunit Deficiency Results in Severe Enterovirus Myocarditis.* PLoS Pathogens, Vol. 7
- Peters JM, Cejka Z, Harris JR, Kleinschmidt JA, Baumeister W, 1995.  
*Structural features of the 26S Proteasome Complex.* J. Mol. Biol., Vol. 234
- Peth A, Besche HC, Goldberg AL, 2009.  
*Ubiquitinated Proteins Activate the Proteasome by Binding to Usp14/Ubp6, which Causes 20S Gate Opening.* Mol. Cell, Vol. 36
- Peth A, Uchiki T, Goldberg AL, 2010.  
*ATP-Dependent Steps in the Binding of Ubiquitin Conjugates to the 26S Proteasome that Commit to Degradation.* Mol. Cell, Vol. 40
- Peth A, Kukushkin N, Bossé M, Goldberg AL, 2013.  
*Ubiquitinated Proteins activate the Proteasomal ATPases by Binding to Usp14 or Uch37.* JBC, Vol. 288
- Prakash S, Matouschek A, 2004.  
*Protein unfolding in the cell.* TRENDS in Biochemical Sciences, Vol.29, No.11
- Princiotta MF, Finzi D, Qian S, Gibbs J, Schuchmann S, Buttgereit F, Bennink JR, Yewdell JW, 2003.  
*Quantitating Protein Synthesis, Degradation and Endogenous Antigen Processing.* Immunity, Vol. 18
- Raschke WC, Baird S, Ralph P, Nakoinz I, 1978.  
*Functional Macrophage Cell Lines Transformed by Abelson Leukemia Virus.* Cell, Vol. 15
- Realini C, Dubiel W, Pratt G, Ferrell K, Rechsteiner M, 1994.  
*Molecular cloning and expression of a gamma-interferon-inducible activator of the multicatalytic protease.* J Biol Chem, Vol. 269
- Rechsteiner M, Realini C, Ustrell V, 2000.  
*The proteasome activator 11 S REG (PA28) and Class I antigen presentation.* Biochem. J., Vol. 345
- Rechsteiner M, Hill CP, 2005.  
*Mobilizing the proteolytic machine: cell biological roles of proteasome activators and inhibitors.* TRENDS in Cell Biology, Vol.15, No.1
- Rock KL, Goldberg AL, 1999.  
*Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I presented peptides.* Annu. Rev. Immunol., Vol. 17
- Russell SJ, Steger KA, Johnston SA, 1999.  
*Subcellular Localization, Stoichiometry, and Protein Levels of 26 S Proteasome Subunits in Yeast.* JBC, Vol. 274, No. 31
- Sadler AJ, Williams BRG, 2008.  
*Interferon-inducible antiviral effectors.* NATURE Reviews Immunology, Vol. 8
- Saeki Y, Tanaka K, 2007.  
*Unlocking the Proteasome Door.* Mol. Cell, Vol. 27



Savulescu AF, Glickman MH, 2011.

*Proteasome Activator 200: The HEAT is on...* Molecular & Cellular Proteomics, Vol. 10.5

Schubert U, Anton LC, Gibbs J, Norbury CC, Yewdell YW, Bennink JR, 2000.

*Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes.* NATURE, Vol. 404

Seifert U, Bialy LP, Ebstein F, Bech-Otschir D, Voigt A, Schröter F, Prozorovski T, Lange N, Steffen J, Rieger M, Kuckelkorn U, Aktas O, Kloetzel PM, Krüger E, 2010.

*Immunoproteasomes Preserve Protein Homeostasis upon Interferon-Induced Oxidative Stress.* Cell, Vol. 142

Sha Z, Brill LM, Cabrera R, Kleifeld O, Scheliga JS, Glickman MH, Chang EC, Wolf DA, 2009.

*The eIF3 interactome reveals the translatasome, a supercomplex linking protein synthesis and degradation machineries.* Mol. Cell., Vol. 36, No. 1

Shabek N, Herman-Bachinsky Y, Buchsbaum S, Lewinson O, Haj-Yahya M, Hejjaoui M, Lashuel HA, Sommer T, Brik A, Ciechanover A, 2012.

*The Size of the Proteasomal Substrate Determines Whether Its Degradation Will Be Mediated by Mono- or Polyubiquitylation.* Mol Cell, Vol. 48

Sijts EJAM, Kloetzel PM, 2011.

*The role of the proteasome in the generation of MHC I ligands and immune response.* Cell. Mol. Life Sci., Vol. 68

Stadtmueller BM, Hill CP, 2011.

*Proteasome Activators.* Mol. Cell Review, Vol. 41

Stohwasser R, Salzmann U, Giesebrecht J, Kloetzel PM Holzhütter HG, 2000.

*Kinetic evidences for facilitation of peptide channelling by the proteasome activator PA28.* Eur. J. Biochem., Vol. 267

Strehl B, Textoris-Taube K, Jäkel S, Voigt A, Henklein P, Steinhoff U, Kloetzel PM, Kuckelkorn U, 2008.

*Antitopes Define Preferential Proteasomal Cleavage Site Usage.* JBC, Vol. 283, No. 26

Sun Y, Sijts AJAM, Song M, Janek K, Nussbaum AK, Kral S, Schirle M, Stefanovic S, Paschen A, Schild H, Kloetzel PM, Schadendorf D, 2002.

*Expression of the Proteasome Activator PA28 Rescues the Presentation of a Cytotoxic T Lymphocyte Epitope on Melanoma Cells.* Cancer Research, Vol. 62

Tanahashi N, Murakami Y, Minami Y, Shimbarai N, Hendil KB, Tanaka K, 2000.

*Hybrid Proteasomes.* JBC, Vol. 275, No. 19

Textoris-Taube K, Henklein P, Pollmann S, Bergann T, Weisshoff H, Seifert U, Drung I, Mügge C, Sijts AJAM, Kloetzel PM, Kuckelkorn U, 2007.

*The N-terminal Flanking Region of the TRP2<sub>360-368</sub> Melanoma Antigen Determines Proteasome Activator PA28.* JBC, Vol. 282, No. 17

Tokumoto M, Horiguchi R, Nagahama Y, Ishikawa K, Tokumoto T, 2000.

*Two proteins, a goldfish 20S proteasome subunit and the protein interacting with 26S proteasome, change in the meiotic cell cycle.* Eur. J. Biochem., Vol. 267

- Tomko RJ, Hochstrasser M, 2011.  
*Order of the Proteasomal ATPases and Eukaryotic Proteasome*. Assembly Cell Biochem Biophys, Vol. 60
- Ustrell V, Hoffman L, Pratt G, Rechsteiner M, 2002.  
*PA200, a nuclear proteasome activator involved in DNA repair*. The EMBO Journal, Vol. 21, No. 13
- Verma R, Chen S, Feldman R, Schieltz D, Yates J, Dohmen J, Deshaies RJ, 2000.  
*Proteasomal Proteomics: Identification of Nucleotidesensitive Proteasome-interacting Proteins by Mass Spectrometric Analysis of Affinity-purified Proteasomes*. Molecular Biology of the Cell, Vol. 11
- Verma R, Aravind L, Oania R, McDonald WH, JR Yates, Koonin EV, Deshaies RJ, 2002.  
*Role of Rpn11 Metalloprotease in Deubiquitination and Degradation by the 26S Proteasome*. Science, Vol. 298
- Vigneron N & van den Eynde B, 2012.  
*Proteasome subtypes and the processing of tumor antigens: increasing antigenic diversity*. Current Opinion in Immunology, Vol. 24
- Wang X, Li J, Zheng H, Su H, Powel SR, 2011.  
*Proteasome functional insufficiency in cardiac pathogenesis*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, Vol. 301
- Warnatsch A, Bergann T, Krüger E, 2012.  
*Oxidation matters: The ubiquitin proteasome system connects innate immune mechanisms with MHC class I antigen presentation*. Molecular Immunology, Vol. 54
- Weissman A, Shabek N, Ciechanover A, 2011.  
*The predator becomes the prey: regulating the ubiquitin system by ubiquitylation and degradation*. NATURE Review Molecular Cell Biology, Vol. 12
- Whitby FG, Masters EI, Kramer L, Knowlton JR, Yao Y, Wang CC Hill CP, 2000.  
*Structural basis for the activation of 20S proteasomes by 11S regulators*. NATURE, Vol. 408
- Yewdell YW, Reits E, Neefjes J, 2003.  
*Making sense of mass destruction: Quantitating MHC class I antigen presentation*. NATURE Review Immunology, Vol. 3
- Yewdell JW, Princiotta MF, 2012.  
*All roads lead to "ome": defining the DRiPome*. Blood, Vol. 119, No. 26
- Zhang Z, Clawson A, Rechsteiner M, 1998.  
*The Proteasome Activator 11 S Regulator or PA28*. JBC, Vol. 273, No. 46
- Zhang F, Hu Y, Huang P, Toleman CA, Paterson AJ, Kudlow JE, 2007.  
*Proteasome Function Is Regulated by Cyclic AMP-dependent Protein Kinase through Phosphorylation of Rpt6*. JBC, Vol. 282, No. 31
- Zhao M, Zhang N, Zurawel A, Hansen KC, Liu C, 2009.  
*Degradation of Some Polyubiquitinated Proteins Requires an Intrinsic Proteasomal Binding Element in the Substrates*. JBC, Vol. 285, No. 7

## Anhang

### 1.) Massenspektrometrische Auswertung der nativen PAGE des Totallysates von Raw264.7 Makrophagen (vgl. Tab. 3-1)

#### Kodierung:

Proteasomale Untereinheiten

Komponenten der Proteinbiosynthese

**TriC Untereinheiten**

Andere Proteine

Rank	Accession No. (x_mouse)	Protein Name	Mascot Score	MW	No. of Peptides Matched	Sequence Coverage	pI
1	MYH9	Q8VDD5 Myosin-9	4421	226232	57	30	5,5
2	EF2	P58252 Elongation factor 2	2164	95253	28	38	6,4
3	HSP7C	P63017 Heat shock cognate 71 kDa protein	1158	70827	13	27	5,4
4	KPYM	P52480 Pyruvate kinase isozymes M1/M2	1116	57808	14	31	7,2
5	LDHA	P06151 L-lactate dehydrogenase A chain	874	36475	9	28	7,6
6	EF1A1	P10126 Elongation factor 1-alpha 1	824	50082	14	29	9,1
7	HS90A	P07901 Heat shock protein HSP 90-alpha	762	84735	9	15	4,9
8	HS90B	P11499 Heat shock protein HSP 90-beta	756	83229	9	15	5,0
9	ACTB	P60710 Actin, cytoplasmic 1	736	41710	12	41	5,3
10	RL6	P47911 60S ribosomal protein L6	711	33489	9	24	10,7
11	EF1G	Q9D8N0 Elongation factor 1-gamma	658	50029	9	22	6,3
12	TCPH	P80313 T-complex protein 1 subunit eta	626	59614	8	21	8,0
13	PGK1	P09411 Phosphoglycerate kinase 1	617	44522	5	23	8,0
14	SERA	Q61753 D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	616	56549	7	18	6,1
15	TCPB	P80314 T-complex protein 1 subunit beta	599	57441	7	18	6,0
16	RL4	Q9D8E6 60S ribosomal protein L4	596	47124	8	25	11,0
17	RL7	P14148 60S ribosomal protein L7	584	31400	7	31	10,9
18	RAN	P62827 GTP-binding nuclear protein Ran	579	24408	7	37	7,0
19	RS8	P62242 40S ribosomal protein S8	571	24190	7	36	10,3
20	GBLP	P68040 Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1	553	35055	6	25	7,6
21	RL15	Q9CZM2 60S ribosomal protein L15	548	24131	9	43	11,6
22	RLA0	P14869 60S acidic ribosomal protein P0	540	34195	5	29	5,9

23	SYNC	Q8BP47 Asparagine--tRNA ligase, cytoplasmic	530	64238	7	17	5,6
24	RL12	P35979 60S ribosomal protein L12	521	17794	4	40	9,5
25	TBA1A	P68369 Tubulin alpha-1A chain	514	50104	6	20	4,9
26	TBA1B	P05213 Tubulin alpha-1B chain	514	50120	6	20	4,9
28	MOES	P26041 Moesin	503	67725	7	12	6,2
29	G3P	P16858 Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	479	35787	5	20	8,4
30	TCPA	P11983 T-complex protein 1 subunit alpha	475	60411	6	13	5,8
31	RL3	P27659 60S ribosomal protein L3	469	46081	7	17	10,2
32	HNRPU	Q8VEK3 Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U	464	87863	5	8	5,9
33	PUR6	Q9DCL9 Multifunctional protein ADE2	448	46976	4	14	6,9
34	RS2	P25444 40S ribosomal protein S2	432	31212	5	23	10,3
35	SYIC	Q8BU30 Isoleucine--tRNA ligase, cytoplasmic	429	144179	6	7	6,1
36	TCPE	P80316 T-complex protein 1 subunit epsilon	422	59586	5	14	5,7
37	SYEP	Q8CGC7 Bifunctional glutamate/proline--tRNA ligase	420	169972	5	5	7,8
38	ACTC	P68033 Actin, alpha cardiac muscle 1	419	41992	6	20	5,2
39	RS3A	P97351 40S ribosomal protein S3a	416	29866	5	19	9,8
40	RS4X	P62702 40S ribosomal protein S4, X isoform	365	29579	5	19	10,2
41	ROA2	O88569 Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	363	37380	5	16	9,0
42	PABP1	P29341 Polyadenylate-binding protein 1	361	70626	4	9	9,5
44	NDKB	Q01768 Nucleoside diphosphate kinase B	356	17352	6	41	7,0
45	RS10	P63325 40S ribosomal protein S10	352	18904	4	27	10,2
46	RS3	P62908 40S ribosomal protein S3	350	26657	5	23	9,7
47	PA2G4	P50580 Proliferation-associated protein 2G4	347	43671	5	16	6,4
48	TCPD	P80315 T-complex protein 1 subunit delta	345	58030	4	10	8,2
49	K6PP	Q9WUA3 6-phosphofructokinase type C	340	85400	4	7	6,7
50	ARP3	Q99JY9 Actin-related protein 3	339	47327	4	15	5,6
51	RL30	P62889 60S ribosomal protein L30	337	12776	3	41	9,7
52	DDX3L	P16381 Putative ATP-dependent RNA helicase PI10	328	73095	4	8	6,7
53	RL7A	P12970 60S ribosomal protein L7a	324	29958	4	20	10,6
54	SYRC	Q9D0I9 Arginine--tRNA ligase, cytoplasmic	320	75625	7	11	7,5
55	MYL6	Q60605 Myosin light polypeptide 6	313	16919	4	26	4,6
56	RL18A	P62717 60S ribosomal protein L18a	312	20719	3	16	10,7

57	NDKA	P15532 Nucleoside diphosphate kinase A	311	17197	5	35	6,8
58	RL18	P35980 60S ribosomal protein L18	308	21631	4	22	11,8
59	RL13A	P19253 60S ribosomal protein L13a	303	23449	5	17	11,0
60	RADI	P26043 Radixin	303	68500	4	6	5,9
61	HNRPK	P61979 Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	303	50944	4	11	5,4
62	RS7	P62082 40S ribosomal protein S7	288	22113	4	26	10,1
63	TCPZ	P80317 T-complex protein 1 subunit zeta	282	57968	4	9	6,6
64	SYLC	Q8BMJ2 Leucine--tRNA ligase, cytoplasmic	271	134106	4	5	6,6
65	PUR9	Q9CWJ9 Bifunctional purine biosynthesis protein PURH	265	64177	3	8	6,3
66	RL13	P47963 60S ribosomal protein L13	265	24290	4	18	11,5
68	DDX5	Q61656 Probable ATP-dependent RNA helicase DDX5	261	69247	4	9	9,1
69	RS9	Q6ZWN5 40S ribosomal protein S9	253	22578	6	22	10,7
70	RL23	P62830 60S ribosomal protein L23	250	14856	4	36	10,5
71	K6PL	P12382 6-phosphofructokinase, liver type	248	85305	5	8	6,7
72	RL8	P62918 60S ribosomal protein L8	248	28007	5	16	11,0
74	RL10A	P53026 60S ribosomal protein L10a	247	24901	3	13	10,0
76	RL14	Q9CR57 60S ribosomal protein L14	235	23549	3	15	11,0
77	PSA2	P49722 Proteasome subunit alpha type-2	230	25909	3	20	8,4
79	DYHC1	Q9JHU4 Cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1	229	531710	5	1	6,0
80	SC23B	Q9D662 Protein transport protein Sec23B	229	86382	4	8	6,5
81	TCPG	P80318 T-complex protein 1 subunit gamma	223	60591	4	10	6,3
82	SYK	Q99MN1 Lysine--tRNA ligase	221	67796	4	9	5,7
83	ALDOA	P05064 Fructose-bisphosphate aldolase A	218	39331	4	15	8,3
84	SND1	Q78PY7 Staphylococcal nuclease domain-containing protein 1	217	102025	4	5	7,1
85	RL27A	P14115 60S ribosomal protein L27a	215	16595	3	22	11,1
87	RS13	P62301 40S ribosomal protein S13	214	17212	3	23	10,5
91	RS16	P14131 40S ribosomal protein S16	202	16435	4	23	10,2
92	PSMD3	P14685 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 3	202	60680	3	7	8,5
93	RL35A	O55142 60S ribosomal protein L35a	201	12546	3	16	10,9
94	SYTC	Q9D0R2 Threonine--tRNA ligase, cytoplasmic	198	83303	4	8	7,0
96	TBB5	P99024 Tubulin beta-5 chain	191	49639	5	9	4,8
97	RS11	P62281 40S ribosomal protein S11	188	18419	3	22	10,3
98	RL10L	P86048 60S ribosomal protein L10-like	187	24542	4	14	10,1

102	H4	P62806 Histone H4	179	11360	3	29	11,4
104	MCM6	P97311 DNA replication licensing factor MCM6	177	92809	4	6	5,3
105	RS18	P62270 40S ribosomal protein S18	176	17708	4	21	11,0
107	EIF3B	Q8JZQ9 Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit B	173	91313	4	6	4,9
111	SYDC	Q922B2 Aspartate--tRNA ligase, cytoplasmic	168	57111	3	7	6,1
112	IMDH2	P24547 Inosine-5~-monophosphate dehydrogenase 2	165	55780	3	6	6,8
114	SYMC	Q68FL6 Methionine--tRNA ligase, cytoplasmic	161	101366	4	7	6,8
115	SYVC	Q9Z1Q9 Valine--tRNA ligase	157	140127	3	4	7,9
117	RL26	P61255 60S ribosomal protein L26	154	17248	4	23	10,6
122	ARC1B	Q9WV32 Actin-related protein 2/3 complex subunit 1B	146	41037	3	13	8,7
123	ROA1	P49312 Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	145	34175	3	11	9,3
137	RL27	P61358 60S ribosomal protein L27	124	15788	3	27	10,6
138	TBB4A	Q9D6F9 Tubulin beta-4A chain	123	49554	4	6	4,8
167	SERC	Q99K85 Phosphoserine aminotransferase	95	40447	3	11	8,2

Es wurden viele Komponenten der Proteinbiosynthese detektiert: ribosomale Untereinheiten, tRNA-Ligasen, Initiationsfaktoren, mRNA bindende Proteine sowie Hitzeschockproteine (Hsp90 $\alpha/\beta$  und Hsp70), Elongationsfaktoren und Komponenten des Chaperonins TriC. Die Detektion einer Untereinheit des proteasomalen Kernelements, sowie eine Untereinheit des 19S Regulators legen eine Assoziation von Polysom und Proteasom nahe.

## 2.) Massenspektrometrische Auswertung der Co-Immunpräzipitation mit Totallysat von Raw264.7 Makrophagen (vgl. Tab. 3-2)

### Kodierung:

Proteasomale Untereinheiten  
 Komponenten der Proteinbiosynthese  
**TriC Untereinheiten**  
 Andere Proteine

### Bande 1 (130-95kDa)

Rank	Accession No. (x_mouse)	Protein Name	Mascot Score	MW	No. of Peptides Matched	Sequence Coverage	pI
1	HS90B	P11499 Heat shock protein HSP 90-beta	810	83229	16	25	5,0
2	HS90A	P07901 Heat shock protein HSP 90-alpha	731	84735	14	21	4,9
3	HSP7C	P63017 Heat shock cognate 71 kDa protein	418	70827	8	14	5,4
4	TBB5	P99024 Tubulin beta-5 chain	402	49639	8	18	4,8
5	K2C1	P04104 Keratin, type II cytoskeletal 1	371	65565	6	6	8,4
6	K2C5	Q922U2 Keratin, type II cytoskeletal 5	366	61729	6	8	7,6
7	K1C10	P02535 Keratin, type I cytoskeletal 10	351	57735	11	15	5,0
8	ACTB	P60710 Actin, cytoplasmic 1	307	41710	7	21	5,3
9	SND1	Q78PY7 Staphylococcal nuclease domain-containing protein 1	301	102025	10	10	7,1
13	TCPA	P11983 T-complex protein 1 subunit alpha	212	60411	7	13	5,8
15	TBA1A	P68369 Tubulin alpha-1A chain	210	50104	4	14	4,9
21	PSMD3	P14685 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 3	174	60680	5	11	8,5
23	RL6	P47911 60S ribosomal protein L6	156	33489	3	9	10,7
25	EF2	P58252 Elongation factor 2	155	95253	4	5	6,4
26	PSMD2	Q8VDM4 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2	153	100139	6	8	5,1
28	RL26	P61255 60S ribosomal protein L26	126	17248	3	17	10,6
29	TLN1	P26039 Talin-1	123	269653	4	2	5,8

Im Molekulargewichtsbereich zwischen 130 kDa und 95 kDa lässt sich eine Untereinheit des 19S Regulators signifikant detektieren (Rpn2, MW 100kDa), was auf eine Kopräzipitation des 19S Regulators hinweist. Des Weiteren lassen sich Hsp90α/β und Hsp70 signifikant detektieren.

Bande 2 (95-80 kDa)

Rank	Accession No. (x_mouse)	Protein Name	Mascot Score	MW	No. of Peptides Matched	Sequence Coverage	pI
1	HS90B	P11499 Heat shock protein HSP 90-beta	1631	83229	27	36	5,0
2	HS90A	P07901 Heat shock protein HSP 90-alpha	1466	84735	23	30	4,9
3	HSP7C	P63017 Heat shock cognate 71 kDa protein	729	70827	13	25	5,4
4	GRP78	P20029 78 kDa glucose-regulated protein	421	72377	11	22	5,1
5	TBB5	P99024 Tubulin beta-5 chain	401	49639	8	18	4,8
6	K1C10	P02535 Keratin, type I cytoskeletal 10	356	57735	10	13	5,0
7	PSMD2	Q8VDM4 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2	354	100139	8	10	5,1
8	ENPL	P08113 Endoplasmin	345	92418	7	11	4,7
9	ACTB	P60710 Actin, cytoplasmic 1	335	41710	7	21	5,3
10	PSMD3	P14685 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 3	331	60680	7	15	8,5
11	K2C5	Q922U2 Keratin, type II cytoskeletal 5	305	61729	5	7	7,6
12	TBA1B	P05213 Tubulin alpha-1B chain	301	50120	6	21	4,9
15	K6PP	Q9WUA3 6-phosphofructokinase type C	252	85400	9	14	6,7
16	EF2	P58252 Elongation factor 2	246	95253	5	6	6,4
17	MCM6	P97311 DNA replication licensing factor MCM6	236	92809	4	5	5,3
18	TCPA	P11983 T-complex protein 1 subunit alpha	217	60411	4	9	5,8
25	EF1A1	P10126 Elongation factor 1-alpha 1	174	50082	3	7	9,1
26	TRAP1	Q9CQN1 Heat shock protein 75 kDa, mitochondrial	173	80159	3	5	6,3
29	DIAP1	O08808 Protein diaphanous homolog 1	160	139255	5	4	5,4
30	LONM	Q8CGK3 Lon protease homolog, mitochondrial	159	105776	5	6	6,2
32	RL6	P47911 60S ribosomal protein L6	145	33489	3	9	10,7
35	KIF11	Q6P9P6 Kinesin-like protein KIF11	132	117953	4	4	5,7
36	EIF3C	Q8R1B4 Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit C	123	105465	3	3	5,6
39	MOES	P26041 Moesin	115	67725	4	5	6,2
41	RL26	P61255 60S ribosomal protein L26	106	17248	3	17	10,6



Im Molekulargewichtsbereich zwischen 95 kDa und 80 kDa lassen sich vor allem die Hitzeschockproteine Hsp90 $\alpha/\beta$  und Hsp70 signifikant detektieren, zudem der analysierte Bereich ihrem Molekulargewicht entspricht.

### Bande 3 (80kDa)

Rank	Accession No. (x_mouse)	Protein Name	Mascot Score	MW	No. of Peptides Matched	Sequence Coverage	pI
1	HSP7C	P63017 Heat shock cognate 71 kDa protein	1491	70827	30	46	5,4
2	HS90B	P11499 Heat shock protein HSP 90-beta	1163	83229	23	31	5,0
3	TCPG	P80318 T-complex protein 1 subunit gamma	568	60591	13	22	6,3
4	HS90A	P07901 Heat shock protein HSP 90-alpha	496	84735	11	14	4,9
5	PSMD3	P14685 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 3	464	60680	8	18	8,5
6	TBB5	P99024 Tubulin beta-5 chain	420	49639	10	21	4,8
7	TBA1B	P05213 Tubulin alpha-1B chain	356	50120	8	25	4,9
8	K1C10	P02535 Keratin, type I cytoskeletal 10	322	57735	10	11	5,0
9	TRAP1	Q9CQN1 Heat shock protein 75 kDa, mitochondrial	317	80159	6	11	6,3
10	CH60	P63038 60 kDa heat shock protein, mitochondrial	316	60917	6	13	5,9
11	K2C5	Q922U2 Keratin, type II cytoskeletal 5	314	61729	6	9	7,6
13	TCPA	P11983 T-complex protein 1 subunit alpha	294	60411	6	11	5,8
15	ACTB	P60710 Actin, cytoplasmic 1	241	41710	6	16	5,3
17	TCPE	P80316 T-complex protein 1 subunit epsilon	233	59586	6	11	5,7
18	K1C15	Q61414 Keratin, type I cytoskeletal 15	226	49107	5	9	4,8
25	EF1A1	P10126 Elongation factor 1-alpha 1	171	50082	3	7	9,1
26	TCPD	P80315 T-complex protein 1 subunit delta	169	58030	4	9	8,2
27	NUCL	P09405 Nucleolin	166	76677	5	10	4,7
28	PRS4	P62192 26S protease regulatory subunit 4	166	49154	4	10	5,9
29	BAG6	Q9Z1R2 Large proline-rich protein BAG6	165	120962	3	4	5,5
31	RL6	P47911 60S ribosomal protein L6	163	33489	4	14	10,7
33	DIAP1	O08808 Protein diaphanous homolog 1	159	139255	4	4	5,4

Im Molekulargewichtsbereich um 80 kDa lassen sich Hsp90 $\alpha/\beta$ , Hsp70 und Komponenten des Chaperonins TriC/CCT signifikant detektieren. Der analysierte Bereich entspricht dem Molekulargewicht der Hitzeschockproteine.

Bande 4 (72kDa)

Rank	Accession No. (x_mouse)	Protein Name	Mascot Score	MW	No. of Peptides Matched	Sequence Coverage	pI
1	CH60	P63038 60 kDa heat shock protein, mitochondrial	1059	60917	19	37	5,9
2	TBB5	P99024 Tubulin beta-5 chain	771	49639	17	37	4,8
3	NUCL	P09405 Nucleolin	716	76677	14	20	4,7
4	TBB4B	P68372 Tubulin beta-4B chain	683	49799	15	33	4,8
5	TBA1B	P05213 Tubulin alpha-1B chain	631	50120	13	35	4,9
7	PRS4	P62192 26S protease regulatory subunit 4	611	49154	16	35	5,9
10	TCPD	P80315 T-complex protein 1 subunit delta	489	58030	12	18	8,2
12	TCPA	P11983 T-complex protein 1 subunit alpha	446	60411	9	16	5,8
14	HS90B	P11499 Heat shock protein HSP 90-beta	421	83229	11	17	5,0
15	TCPG	P80318 T-complex protein 1 subunit gamma	411	60591	9	17	6,3
16	TCPE	P80316 T-complex protein 1 subunit epsilon	409	59586	10	20	5,7
18	TCPQ	P42932 T-complex protein 1 subunit theta	393	59518	8	14	5,4
19	TCPB	P80314 T-complex protein 1 subunit beta	382	57441	12	27	6,0
20	UBP14	Q9JMA1 Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 14	356	55966	7	17	5,2
21	SERA	Q61753 D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	309	56549	6	11	6,1
22	HSP7C	P63017 Heat shock cognate 71 kDa protein	308	70827	7	13	5,4
23	ACTB	P60710 Actin, cytoplasmic 1	304	41710	8	21	5,3
24	TCPH	P80313 T-complex protein 1 subunit eta	292	59614	7	16	8,0
25	DNJC7	Q9QYI3 DnaJ homolog subfamily C member 7	285	56440	6	12	6,1
26	K2C5	Q922U2 Keratin, type II cytoskeletal 5	272	61729	4	7	7,6
27	K1C10	P02535 Keratin, type I cytoskeletal 10	268	57735	8	11	5,0
28	TCPZ	P80317 T-complex protein 1 subunit zeta	252	57968	7	12	6,6
29	STIP1	Q60864 Stress-induced-phosphoprotein 1	225	62542	5	11	6,4
30	K2C1	P04104 Keratin, type II cytoskeletal 1	199	65565	4	5	8,4
31	BAG6	Q9Z1R2 Large proline-rich protein BAG6	191	120962	6	7	5,5
33	HS90A	P07901 Heat shock protein HSP 90-alpha	186	84735	5	7	4,9
34	NFKB2	Q9WTK5 Nuclear factor NF-kappa-B p100 subunit	178	96772	3	4	5,9

35	TRAP1	Q9CQN1 Heat shock protein 75 kDa, mitochondrial	175	80159	3	5	6,3
36	K1C15	Q61414 Keratin, type I cytoskeletal 15	173	49107	5	8	4,8
39	EF1A1	P10126 Elongation factor 1-alpha 1	149	50082	3	7	9,1
41	PSMD3	P14685 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 3	118	60680	3	6	8,5
42	PRS6B	P54775 26S protease regulatory subunit 6B	104	47379	3	8	5,1

Im Molekulargewichtsbereich um 72 kDa lassen sich alle Untereinheiten des Chaperonins TriC/CCT signifikant detektieren. Dieser analysierte Bereich entspricht ihrem Molekulargewicht. Des Weiteren können Untereinheiten des 19S Regulators signifikant detektiert werden; der analysierte Bereich entspricht ihrem Molekulargewicht.

#### Bande 5 (70-55 kDa)

Rank	Accession No. (x_mouse)	Protein Name	Mascot Score	MW	No. of Peptides Matched	Sequence Coverage	pI
1	TBB5	P99024 Tubulin beta-5 chain	1420	49639	25	44	4,8
2	TBB4B	P68372 Tubulin beta-4B chain	1215	49799	24	42	4,8
3	TBA1B	P05213 Tubulin alpha-1B chain	1193	50120	17	40	4,9
11	HS90B	P11499 Heat shock protein HSP 90-beta	708	83229	11	16	5,0
12	CH60	P63038 60 kDa heat shock protein, mitochondrial	642	60917	7	18	5,9
13	PRS6B	P54775 26S protease regulatory subunit 6B	483	47379	9	22	5,1
14	F203A	Q8C3I8 Protein FAM203A	479	42889	7	23	4,7
15	TCPB	P80314 T-complex protein 1 subunit beta	437	57441	7	16	6,0
16	PSD12	Q9D8W5 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 12	400	52861	6	17	6,7
17	SERA	Q61753 D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	392	56549	7	13	6,1
18	PRS7	P46471 26S protease regulatory subunit 7	387	48617	6	11	5,7
19	ACTB	P60710 Actin, cytoplasmic 1	387	41710	6	18	5,3
20	PRS6A	O88685 26S protease regulatory subunit 6A	379	49518	9	23	5,1
22	PRS8	P62196 26S protease regulatory subunit 8	347	45597	5	18	7,1

23	TCPD	<b>P80315 T-complex protein 1 subunit delta</b>	340	58030	5	13	8,2
24	IF4A1	<b>P60843 Eukaryotic initiation factor 4A-I</b>	311	46125	6	17	5,3
25	PSD11	<b>Q8BG32 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 11</b>	259	47407	4	11	6,1
26	NUCL	P09405 Nucleolin	250	76677	3	6	4,7
27	RUVB2	Q9WTM5 RuvB-like 2	230	51081	5	13	5,5
28	EIF3F	<b>Q9DCH4 Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit F</b>	221	37960	3	12	5,3
29	SNX5	Q9D8U8 Sorting nexin-5	201	46768	3	9	6,2
30	EF1A1	<b>P10126 Elongation factor 1-alpha 1</b>	198	50082	3	7	9,1
31	RL6	<b>P47911 60S ribosomal protein L6</b>	184	33489	4	15	10,7
32	PABP1	<b>P29341 Polyadenylate-binding protein 1</b>	183	70626	2	5	9,5
33	K1C10	P02535 Keratin, type I cytoskeletal 10	171	57735	6	10	5,0
34	K2C1	P04104 Keratin, type II cytoskeletal 1	166	65565	3	3	8,4
35	PSMD5	<b>Q8BJY1 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 5</b>	160	55937	4	9	5,1
36	DCTN2	Q99KJ8 Dynactin subunit 2	155	44090	3	9	5,1

Im Molekulargewichtsbereich zwischen 70 kDa und 55 kDa können vor allem Untereinheiten des 19S Regulators signifikant detektiert werden; der analysierte Bereich entspricht ihrem Molekulargewicht. Des Weiteren können Untereinheiten von Tric/CCT und der Elongationsfaktor E1 $\alpha$ 1 signifikant detektiert werden, ebenfalls ihrem Molekulargewicht entsprechend.

#### Bande 6 (55-43 kDa)

Rank	Accession No. (x mouse)	Protein Name	Mascot Score	MW	No. of Peptides Matched	Sequence Coverage	pI
1	TBA1B	P05213 Tubulin alpha-1B chain	1270	50120	19	47	4,9
2	TBB5	P99024 Tubulin beta-5 chain	1149	49639	20	40	4,8
8	ACTB	P60710 Actin, cytoplasmic 1	780	41710	13	31	5,3
10	PSD11	<b>Q8BG32 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 11</b>	651	47407	10	24	6,1
11	PRS10	<b>P62334 26S protease regulatory subunit 10B</b>	629	44145	8	23	7,1
13	HS90B	<b>P11499 Heat shock protein HSP 90-beta</b>	612	83229	9	13	5,0
15	K1C10	P02535 Keratin, type I cytoskeletal 10	556	57735	12	15	5,0
16	RSSA	<b>P14206 40S ribosomal protein SA</b>	554	32817	6	24	4,8
17	CH60	P63038 60 kDa heat shock protein, mitochondrial	413	60917	7	12	5,9

18	ALDOA	P05064 Fructose-bisphosphate aldolase A	385	39331	7	23	8,3
19	PSD13	Q9WVJ2 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 13	375	42782	6	18	5,5
20	K2C5	Q922U2 Keratin, type II cytoskeletal 5	339	61729	6	8	7,6
21	IDH3A	Q9D6R2 Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha, mitochondrial	338	39613	5	19	6,3
22	K2C1	P04104 Keratin, type II cytoskeletal 1	335	65565	5	5	8,4
23	PA2G4	P50580 Proliferation-associated protein 2G4	267	43671	6	18	6,4
27	PRS8	P62196 26S protease regulatory subunit 8	231	45597	7	23	7,1
28	EF1A1	P10126 Elongation factor 1-alpha 1	223	50082	4	12	9,1
31	PRS7	P46471 26S protease regulatory subunit 7	210	48617	4	12	5,7
32	PLIN3	Q9DBG5 Perilipin-3	195	47233	5	8	5,5
34	IF4A1	P60843 Eukaryotic initiation factor 4A-I	189	46125	5	14	5,3
36	SERA	Q61753 D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	183	56549	4	8	6,1
39	EIF3F	Q9DCH4 Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit F	181	37960	4	16	5,3
44	EF2	P58252 Elongation factor 2	164	95253	3	4	6,4
45	EXOC7	O35250 Exocyst complex component 7	162	79910	5	8	6,5
47	TCPB	P80314 T-complex protein 1 subunit beta	155	57441	5	12	6,0
53	HSP7	P63017 Heat shock cognate 71 kDa protein	126	70827	5	9	5,4

Im Molekulargewichtsbereich zwischen 55 kDa und 43 kDa können hauptsächlich Untereinheiten des 19S Regulators detektiert werden, was ihrem Molekulargewicht entspricht. Des Weiteren können Translationsinitiationsfaktoren detektiert werden.

#### Bande 7 (43-34 kDa)

Rank	Accession No. (x_mouse)	Protein Name	Mascot Score	MW	No. of Peptides Matched	Sequence Coverage	pI
1	HS90B	P11499 Heat shock protein HSP 90-beta	744	83229	15	22	5,0
2	TBB5	P99024 Tubulin beta-5 chain	576	49639	14	30	4,8
3	HNRPK	P61979 Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	442	50944	5	12	5,4
7	TBA1B	P05213 Tubulin alpha-1B chain	366	50120	7	21	4,9
9	RL6	P47911 60S ribosomal protein L6	359	33489	6	20	10,7
12	K1C10	P02535 Keratin, type I cytoskeletal 10	281	57735	7	9	5,0

13	G3P	P16858 Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	277	35787	7	24	8,4
15	ALDOA	P05064 Fructose-bisphosphate aldolase A	258	39331	5	17	8,3
16	RS3A	<b>P97351 40S ribosomal protein S3a</b>	<b>254</b>	<b>29866</b>	<b>6</b>	<b>17</b>	<b>9,8</b>
17	DDX20	Q9JJY4 Probable ATP-dependent RNA helicase DDX20	203	91653	6	8	6,3
18	ARHG1	Q61210 Rho guanine nucleotide exchange factor 1	200	102741	4	5	5,4
19	EF1A1	<b>P10126 Elongation factor 1-alpha 1</b>	<b>196</b>	<b>50082</b>	<b>6</b>	<b>15</b>	<b>9,1</b>
20	PAIRB	Q9CY58 Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein	185	44687	5	13	8,6
22	TCPB	<b>P80314 T-complex protein 1 subunit beta</b>	<b>174</b>	<b>57441</b>	<b>4</b>	<b>9</b>	<b>6,0</b>
23	EF2	<b>P58252 Elongation factor 2</b>	<b>173</b>	<b>95253</b>	<b>4</b>	<b>6</b>	<b>6,4</b>
24	GAK	Q99KY4 Cyclin-G-associated kinase	169	143550	7	4	5,5
26	RLA0	<b>P14869 60S acidic ribosomal protein P0</b>	<b>165</b>	<b>34195</b>	<b>4</b>	<b>22</b>	<b>5,9</b>
28	TXNL1	Q8CDN6 Thioredoxin-like protein 1	158	32217	4	25	4,8
29	TCPZ	<b>P80317 T-complex protein 1 subunit zeta</b>	<b>158</b>	<b>57968</b>	<b>3</b>	<b>7</b>	<b>6,6</b>
30	RSSA	<b>P14206 40S ribosomal protein SA</b>	<b>156</b>	<b>32817</b>	<b>3</b>	<b>15</b>	<b>4,8</b>
32	PRS6B	<b>P54775 26S protease regulatory subunit 6B</b>	<b>152</b>	<b>47379</b>	<b>3</b>	<b>7</b>	<b>5,1</b>
34	ACTB	P60710 Actin, cytoplasmic 1	152	41710	4	12	5,3
35	PSME2	<b>P97372 Proteasome activator complex subunit 2</b>	<b>147</b>	<b>27040</b>	<b>4</b>	<b>25</b>	<b>5,5</b>
37	PCBP1	P60335 Poly(rC)-binding protein 1	136	37474	4	14	6,7

Bande 8 (34-26 kDa)

Rank	Accession No. (x_mouse)	Protein Name	Mascot Score	MW	No. of Peptides Matched	Sequence Coverage	pI
1	TBA1B	P05213 Tubulin alpha-1B chain	773	50120	14	35	4,9
4	PSME1	<b>P97371 Proteasome activator complex subunit 1</b>	<b>657</b>	<b>28655</b>	<b>13</b>	<b>56</b>	<b>5,7</b>
5	TBB5	P99024 Tubulin beta-5 chain	621	49639	15	28	4,8
6	TCPZ	<b>P80317 T-complex protein 1 subunit zeta</b>	<b>564</b>	<b>57968</b>	<b>14</b>	<b>32</b>	<b>6,6</b>
7	PSA2	P49722 Proteasome subunit alpha type-2	518	25909	8	39	8,4
9	TCPB	<b>P80314 T-complex protein 1 subunit beta</b>	<b>494</b>	<b>57441</b>	<b>10</b>	<b>24</b>	<b>6,0</b>
10	PSME2	<b>P97372 Proteasome activator complex subunit 2</b>	<b>493</b>	<b>27040</b>	<b>11</b>	<b>44</b>	<b>5,5</b>
11	PSA3	O70435 Proteasome subunit alpha type-3	471	28387	10	42	5,3

12	ARHG1	Q61210 Rho guanine nucleotide exchange factor 1	394	102741	7	10	5,4
14	PSB4	P99026 Proteasome subunit beta type-4	378	29097	10	39	5,5
15	PSB10	O35955 Proteasome subunit beta type-10	352	29045	5	22	6,4
16	PSB1	O09061 Proteasome subunit beta type-1	348	26355	7	38	7,7
17	PSA7	Q9Z2U0 Proteasome subunit alpha type-7	348	27838	11	48	8,6
18	PSA5	Q9Z2U1 Proteasome subunit alpha type-5	339	26394	5	28	4,7
19	PSA1	Q9R1P4 Proteasome subunit alpha type-1	322	29528	7	30	6,0
20	PSA4	Q9R1P0 Proteasome subunit alpha type-4	313	29452	7	19	7,6
21	TCPD	P80315 T-complex protein 1 subunit delta	312	58030	6	13	8,2
22	PSMD8	Q9CX56 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 8	285	39905	7	16	9,6
23	PSB3	Q9R1P1 Proteasome subunit beta type-3	252	22949	4	23	6,2
24	PSA6	Q9QUM9 Proteasome subunit alpha type-6	233	27355	3	17	6,3
25	RL13	P47963 60S ribosomal protein L13	198	24290	5	23	11,5
26	K2C6A	P50446 Keratin, type II cytoskeletal 6A	191	59299	5	9	8,0
28	GBLP	P68040 Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1	185	35055	3	10	7,6
29	HS90B	P11499 Heat shock protein HSP 90-beta	184	83229	6	10	5,0
30	RS9	Q6ZWN5 40S ribosomal protein S9	177	22578	6	23	10,7
31	K1C10	P02535 Keratin, type I cytoskeletal 10	176	57735	4	7	5,0
32	PCBP1	P60335 Poly(rC)-binding protein 1	176	37474	4	14	6,7
34	CAB39	Q06138 Calcium-binding protein 39	169	39818	4	10	6,4
36	NUBP2	Q9R061 Cytosolic Fe-S cluster assembly factor NUBP2	158	29499	4	20	6,1
39	RS3A	P97351 40S ribosomal protein S3a	153	29866	3	11	9,8
40	RL6	P47911 60S ribosomal protein L6	153	33489	5	20	10,7
41	HNRPK	P61979 Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	151	50944	3	8	5,4
42	NEDD4	P46935 E3 ubiquitin-protein ligase NEDD4	147	102642	3	5	5,1
43	RS8	P62242 40S ribosomal protein S8	147	24190	3	17	10,3
44	RS3	P62908 40S ribosomal protein S3	145	26657	3	17	9,7
45	CPNS1	O88456 Calpain small subunit 1	137	28445	3	18	5,4
48	PSB2	Q9R1P3 Proteasome subunit beta type-2	129	22892	3	19	6,5
50	TCPH	P80313 T-complex protein 1 subunit eta	118	59614	4	9	8,0
53	RS7	P62082 40S ribosomal protein S7	109	22113	3	22	10,1

In diesem Molekulargewichtsbereich lassen sich hauptsächlich proteasomale Untereinheiten des 20S *core* Komplexes signifikant detektieren, was ihrem Molekulargewicht entspricht.

## Abkürzungsverzeichnis

2D	zweite Dimension
Å	Angstrom, 0,1 nm
AAA	<i>ATPases Associated with diverse cellular Activities</i>
AA	Acrylamid
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
ALIS	<i>aggresome-like induced structures</i>
-amc	Amidomethylcoumarin
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
ATP $\gamma$ S	Adenosin 5'-O-(3-thio) triphosphat
AS	Aminosäure
BSA	Bovines Serumalbumin
c20S	konstitutives 20S Proteasom
C57Bl/6	Wildtypmaus
ca.	circa
CCT	<i>chaperonin containing T-complex</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMEM	<i>Dulbeccos modified eagle medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DriPs	<i>defective ribosomal products</i>
DTT	Dithiothreitol
DUB	deubiquitinierendes Enzym
E1	Ub aktivierendes Enzym
E2	Ub konjugierendes Enzym
E3	Ubiquitinligase
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EF1/2	<i>elongation factor 1/2</i>
Epoxo	Epoxomicin
Ecl	<i>enhanced chemiluminescence</i>
ER	endoplasmatisches Retikulum
et al.	und andere
FCS	<i>fetal calf serum</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
Glu	L-Glutamin



<b>h</b>	Stunde
<b>HA</b>	Hämagglutinin
<b>HBVX</b>	Hydrophobe AS, Tyrosin, beliebige AS (= c-terminales Motiv von Rpt2, Rpt3 und Rpt5)
<b>HEAT</b>	<i>Huntington - elongation factor 3 - PR65/A subunit of pp2A – lipid kinase TOR</i>
<b>HECT</b>	<i>homologous to E6AP carboxyl terminus</i>
<b>Hepes</b>	Hydroxyethyl-piperazinethansulfonsäure
<b>HRP</b>	<i>horse radish peroxidase</i>
<b>Hsp</b>	<i>heat shock protein</i>
<b>i20S</b>	20S-Immunoproteasom
<b>i26S</b>	26S-Immunoproteasom
<b>i30S</b>	30S-Immunoproteasom
<b>IFN<math>\gamma</math></b>	Interferon $\gamma$
<b>I<math>\kappa</math>B<math>\alpha</math></b>	<i>inhibitor of NF<math>\kappa</math>B</i>
<b>IP</b>	Immunpräzipitation
<b>JAMM</b>	<i>Jab1/Pad1/MPN metalloenzyme)</i>
<b>K</b>	Lysin
<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>L</b>	Leucin
<b>LB-Medium</b>	<i>lysogeny broth</i> Medium
<b>m20S</b>	<i>mixed type 20S</i>
<b>mA</b>	milli Ampere
<b>MDa</b>	Megadalton
<b>MEF</b>	murine embryonale Fibroblasten
<b>MetOH</b>	Methanol
<b>MHC-I</b>	<i>major histocompatibility complex</i>
<b>NEM</b>	N-Ethylmaleinimid
<b>nm</b>	Nanometer
<b>ODC</b>	<i>ornithin decarboxylase</i>
<b>o-PT</b>	O-Phenanthrolin
<b>PA?</b>	proteasomaler Aktivator
<b>PAC1-4</b>	<i>proteasome assembly chaperone</i>
<b>PAGE</b>	Polyacrylamid Gelelektrophorese
<b>PBS</b>	<i>phosphate buffered saline</i>
<b>PCR</b>	Polymerasekettenreaktion
<b>Pru</b>	<i>Pleckstrin-like receptor for Ubiquitin</i>

P/S	Peniciliin / Streptomycin
pH	pH-Wert ( <i>potentia Hydrogenii</i> )
polyUb	poly-Ubiquitin/(Ub) <sub>n</sub>
POMP	<i>proteasome maturing protein</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RING	<i>really interesting new gene</i>
ROS	reaktive oxidierende Spezies
rpm	<i>rounds per minute</i> / Umdrehungen pro Minute
Rpt	<i>regulatory particle ATPase</i>
Rpn	<i>regulatory particle non ATPase</i>
RT	Raumtemperatur
S. cerevisiae	Saccharomyces cerevisiae
SDS	Natriumdodecylsulfat
STAT1	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
Suc	Saccharose
Tab.	Tabelle
TAP	<i>transporter associated with antigen processing</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Thr	Threonin
TNF $\alpha$	<i>tumor necrosis factor <math>\alpha</math></i>
TriC	<i>Tcp1-ring complex</i> , vgl. CCT
U	Units
Ub / Ubi	Ubiquitin
UBA	<i>Ubiquitin associated</i>
UBL	<i>Ubiquitin like</i>
UCH	<i>ubiquitin c-terminal hydrolase</i>
UE	Untereinheit
UIM	<i>Ubiquitin interacting motif</i>
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
Usp	<i>ubiquitin specific protease</i>
ÜN	über Nacht
UV	ultra violett
V	Volt
V	Valin
v/v	<i>volume/volume</i>
w/v	<i>weight/volume</i>
WT	Wildtyp
Y	Tyrosin

